

Substratabhängige Regulation und Verlauf
der Glyoxysomenbildung bei pflanzlichen
Zellsuspensionskulturen

Artur Lutzenberger

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0013

Substratabhängige Regulation und Verlauf
der Glyoxysomenbildung bei pflanzlichen
Zellsuspensionskulturen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Artur Lutzenberger
München

August 1985

1. Berichterstatter: Prof.Dr.R.R.Theimer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 1985

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	8
1. Pflanzenmaterial.....	8
2. Nährmedien.....	8
3. Anzuchtmethoden.....	9
3.1. Anzucht des Pflanzenmaterials.....	9
3.2. Herstellung von pflanzlichen Gewebekulturen (Kalluskulturen).....	9
3.3. Anzucht von Zellsuspensionskulturen.....	9
4. Bestimmung der Wachstumsparameter.....	10
4.1. Zellernte.....	10
4.2. Bestimmung von pH und Leitfähigkeit.....	10
4.3. Bestimmung von Äpfelsäure und Zitronensäure.....	10
4.4. Bestimmung von Glucose.....	11
4.5. Bestimmung der Zelldichte.....	11
5. Präparation von Rohhomogenaten aus Zell- suspensionskulturen.....	11
6. Dichtegradientenzentrifugation.....	12
7. Messung der Enzymaktivitäten.....	12
7.1. Citratsynthase.....	12
7.2. Enoyl-CoA-Hydratase.....	12
7.3. Fumarase.....	13
7.4. β -Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase.....	13
7.5. Isocitratlyase.....	13
7.6. Katalase.....	14
7.7. Malatdehydrogenase.....	14
7.8. NADH ₂ -Cytochrom c-Reduktase.....	14

8.	Proteinbestimmung.....	15
9.	Bestimmung der Saccharosekonzentration.....	15
10.	Enzymreinigung.....	15
10.1.	Reinigung von Isocitratlyase.....	15
10.1.1.	Präparation des Rohhomogenats.....	15
10.1.2.	Partielle Hitzedenaturierung.....	16
10.1.3.	Ammoniumsulfatfällung.....	16
10.1.4.	Chromatographie an Sephadex G-200.....	16
10.1.5.	Chromatographie an DEAE-Sephacel.....	17
10.2.	Reinigung von Katalase.....	17
11.	Platten-Gel-Elektrophorese in exponentiellen Polyacrylamid-SDS-Gelen.....	17
12.	Molekulargewichtsbestimmung.....	18
12.1.	Bestimmung des Molekulargewichts der Enzym- untereinheiten.....	18
12.2.	Bestimmung des Molekulargewichts der nativen Enzyme.....	18
13.	Immunologische Methoden.....	18
13.1.	Präparation der Antiseren.....	18
13.2.	Immundiffusionstest.....	19
13.3.	Immunelektrophorese.....	19
13.4.	Titration der Enzymextrakte mit Antikörper..	20
13.5.	ELISA.....	20
13.5.1.	Adsorption an Polystyren.....	20
13.5.2.	Kompetitiver Immunttest.....	21
13.6.	Immunoblotting.....	21
C.	<u>Ergebnisse</u>	23
1.	Wachstumsparameter.....	23
2.	Induzierbarkeit der Enzyme des Glyoxylsäure- zyklus bei verschiedenen Zellkulturen.....	26
2.1.	Adaption der Zellkulturen.....	27
2.2.	Induktion von Isocitratlyase.....	27
2.3.	Katalase.....	29

3.	Intrazelluläre Lokalisation von Enzym- aktivitäten in verschiedenen Zellkulturen...	29
3.1.	<u>Cucumis sativus</u>	29
3.2.	<u>Linum usitatissimum</u>	30
3.3.	<u>Ricinus communis</u>	32
3.4.	<u>Coriandrum sativum</u>	32
3.5.	<u>Pimpinella affinis</u>	36
3.6.	<u>Pimpinella anisum</u>	37
4.	Verlauf der Entwicklung von Isocitratlyase- und Katalaseaktivität bei Anis-Zellkulturen.	41
5.	Enzymreinigung.....	44
5.1.	Reinigung von Isocitratlyase.....	45
5.1.1.	Herstellung von Acetonpulver.....	46
5.1.2.	Hitzebehandlung.....	46
5.1.3.	Ammoniumsulfatfällung.....	47
5.1.4.	Gelfiltration.....	48
5.1.5.	Chromatographie an DEAE-Sephacel.....	49
5.2.	Reinigung von Katalase.....	50
5.3.	Homogenität der gereinigten Enzyme Katalase und Isocitratlyase.....	53
5.4.	Molekulargewicht von Katalase und Isocitratlyase.....	54
5.5.	Molekulargewicht der Untereinheiten von Katalase und Isocitratlyase.....	55
5.6.	Kinetische Daten von Isocitratlyase.....	57
5.7.	Antiserencharakteristik.....	58
5.7.1.	Monospezifität der Antiseren.....	58
5.7.2.	Immunologische Beziehung zwischen ICL und CAT aus <u>Helianthus annuus</u> -Kotyledonen und Aniszellkultur.....	60
6.	Induktion und Repression von Isocitratlyase in Aniszellsuspensionskulturen.....	63
6.1.	ELISA: Visualisierung von ICL.....	63
6.2.	Zeitlicher Verlauf der Induktion.....	65
6.2.1.	Verlauf der Induktion bei Saccharoseentzug..	65
6.2.2.	Einfluß von Acetat.....	66

	Seite:
6.2.3. Hemmung der Induktion.....	68
6.3. Repression.....	69
6.3.1. Rohpartikelfraktion.....	69
6.3.2. Rohhomogenat.....	71
7. Immundetektion von Katalase.....	74
D. <u>Diskussion</u>	76
E. <u>Zusammenfassung</u>	87
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	91

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A ₂₈₀	= Absorption bei 280nm
ABTS	= 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat(6))
Act.D	= Actinomycin D
AOX	= Acyl-CoA-Oxidase
BSA	= Rinderserumalbumin
CAT	= Katalase
CCR	= Cytochrom c-Reduktase
CH	= Rohhomogenat = RH
CHI	= Cycloheximid
CPF	= Rohpartikelfraktion = RPF
CROT	= Crotonase
CS	= Citratsynthase
Cyt c	= Cytochrom c
2,4D	= 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DTE	= Dithioerythrit
ELISA	= Enzyme linked immunosorbent assay
ER	= Endoplasmatisches Reticulum
FG	= Frischgewicht
FUM	= Fumarase
GF	= Glyoxysomalfraktion
GOD	= Glucoseoxidase
HAD	= Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase
ICL	= Isocitratlyase
kD	= Kilodalton
LDH	= Lactatdehydrogenase
MDH	= Malatdehydrogenase
M _R	= relatives Molekulargewicht
MS	= Malatsynthase
PBS	= phosphate buffered saline
PMSF	= Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
POD	= Peroxidase
RH	= Rohhomogenat = Rohextrakt = CH

RPF = Rohpartikelfraktion (10000xg Niederschlag)
Sacch = Saccharose
SAR-IgG-HRP = Sheep F(ab)₂ Anti Rabbit Ig-Horseradish
Peroxidase Conjugated
SDG = Saccharosedichtegradient
SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF = Cytoplasmafraktion
SO = Sonnenblumen
TCA = Trichloressigsäure

A. E i n l e i t u n g

Glyoxysomen sind eine zur Gruppe der Peroxisomen gehörende Klasse von Zellorganellen, die vor allem in den Speichergeweben keimender Ölpflanzen, sowie im Aleuron und den Skutella von Zerealien gefunden wurden, wo sie eine vorrangige Stellung in der Umwandlung freier Fettsäuren in Succinat einnehmen (Gerhardt, 1978; Beevers, 1979; Tolbert, 1981; Trelease, 1984). Zu ihrer charakteristischen Enzymausstattung zählen die Enzyme zur Aktivierung und β -Oxidation von Fettsäuren (Cooper und Beevers, 1969; Cooper, 1971) und die des Glyoxylatzylus (Breidenbach und Beevers, 1967), sowie Katalase und H_2O_2 -produzierende Oxidasen und Transaminasen (Theimer und Theimer, 1975; Liu und Huang, 1977).

Eine zweite Klasse pflanzlicher Peroxisomen, die in ergrünenden Kotyledonen und grünen Geweben wie z.B. Blättern vorkommen, wurden Blattperoxisomen genannt und enthalten wichtige Enzyme der Photorespiration, wo im Chloroplasten gebildetes Glycolat in Glycerinsäure umgewandelt wird (Tolbert et al., 1968, 1969, 1971).

Neben diesen spezialisierten Formen treten aber auch morphologisch identische Organelle auf, die unter dem Sammelbegriff "Peroxisomen ohne spezialisierte Funktion" (Huang und Beevers, 1971) zusammengefaßt werden können und in nicht-grünen Pflanzengeweben wie Wurzeln (Huang

und Beevers, 1971; Theimer und Heidinger, 1974) oder Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* (Moore und Beevers, 1974) oder *Rosa ssp. Paul's Scarlet* (Hunt et al., 1978) beobachtet wurden.

Die direkte Beeinflußbarkeit der glyoxysomalen Enzymaktivitäten durch Metabolite als positive und negative Effektoren wurde durch in vitro- Experimente oftmals gezeigt (Gerhardt, 1978; Cioni et al., 1981), jedoch ist die Bedeutung dieser Befunde hinsichtlich der Regulation in vivo bei höheren Pflanzen nicht geklärt.

Die Regulationsmechanismen für die Aktivitätsänderungen glyoxysomaler Enzyme, welche in vivo die Metabolisierung bestimmter Stoffwechselprodukte wie langkettige Fettsäuren, Acetat oder glycolytische Metabolite katalysieren, sind weitgehend unbekannt. Im speziellen wurde bislang bei Eukaryonten eine ausgeprägte Abhängigkeit der Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, Isocitratlyase und Malatsynthase, von spezifischen Substraten eingehender nur bei Algen und Pilzen, nicht aber bei höheren Pflanzen untersucht.

Das Wachstum auf Ethanol, n-Alkanen, Acetat und anderen Fettsäuren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle ist an die Fähigkeit der Organismen gebunden, die anaplerotischen Sequenzen des Glyoxylatzyklus ausführen zu können, was in der Regel in einer Dereprimierung oder Aktivitätssteigerung von ICL und MS angezeigt wird und durch Untersuchungen an den Algen *Chlorella* (Thurston et al., 1973; Thurston, 1977; John et al., 1970; Baechtel et al., 1970; Aasberg, 1974; Mc Cullough und John, 1972b), *Chlamydomonas* (Kudielka, 1980), *Euglena gracilis* (Collins und Merrett, 1975a,b; White und Brody, 1974) und an den Pilzen *Saccharomyces cerevisiae* (Duntze et al., 1969; Szabo und Avers, 1969), *Candida tropicalis* (Nabeshima et al., 1977; Osumi, 1978), *Neurospora crassa* (Flavell und Woodward, 1971; Theimer et al., 1978) belegt ist.

Eine den Glyoxysomen höherer Pflanzen entsprechende Funktion der Algenmicrobodies ist nur für die Microbodies in *Euglena gracilis* nachgewiesen, wenn die Zellen heterotroph auf Acetat oder auf Capronsäure gezogen wurden. Jedoch bestehen unterschiedliche Auffassungen über das Vorkommen von Katalase in dieser Alge (Brown et al., 1975; Brody und White, 1972). Auch die in Pilzen isolierten Glyoxysomen sind nur indirekt mit denen höherer Pflanzen vergleichbar, da diese nur zwei der fünf Enzyme des Glyoxylatzyklus besitzen (Trelease, 1984). Da an höheren Pflanzen die Substratregulation ohne verletzenden Eingriff in das Gewebe schwer zu untersuchen ist, liegen nur einige Hinweise für eine - indirekte - regulatorische Wirkung glycolytisch verwertbarer Zucker auf glyoxysomale Enzyme vor. Im *Ricinus*-Endosperm (Lado et al., 1968) und in fettreichen Kotyledonen (Lado et al., 1968; Hock, 1969; Longo und Longo, 1970) wird die ICL teilweise gehemmt, wenn die Samen in Glucoselösung keimten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Huang und Beevers (1974) gemacht, nachdem sie isolierte, vom Embryo abgetrennte *Ricinus*-Endospermstücke inkubierten. Die Ergebnisse interpretierten die Autoren als einen durch die Zuckerakkumulation bedingten feedback-Effekt auf die Enzymsynthese. Nach Davies und Chapman (1979a) ist die niedrige Fett-Kohlenhydrat-Transformationsrate in embryofreien Gurkenkotyledonen nicht Konsequenz einer geringeren Enzymsynthese durch Endprodukthemmung, sondern auf einen hemmenden Einfluß der Enzymumsatzgeschwindigkeit durch aufgestaute Zucker zurückzuführen. Bislang liegen für höhere Pflanzen keine Daten für eine substratabhängige Induktion von ICL durch Acetat vor, wie es bei Algen (Thurston, 1977; Foo et al., 1971) und Pilzen (Flavell und Woodward, 1970, 1971; Theimer et al., 1978) bekannt ist.

Aufgrund neuerer Befunde (Kudielka et al., 1981; Lutzenberger und Theimer, 1983) bieten Zellsuspensionskulturen

von Pimpinella anisum für Untersuchungen zur substrat-abhängigen Regulation der glyoxysomalen Enzyme und Biogenese ihrer Kompartimente ein geeignetes Modellsystem. Durch Austausch des Nährmediums gegen saccharosefreies oder acetathaltiges werden nicht nur die Enzymaktivitäten ICL und MS induziert, die bei Wachstum in saccharosehaltigem Medium in den Zellen nicht meßbar sind, sondern es werden auch intakte Glyoxysomen gebildet, die in ihrer Enzymausstattung qualitativ und quantitativ denen im Endosperm des Aniskeimlings entsprechen.

Die subzellulären, molekularen Vorgänge der Glyoxysomenbiogenese sind in großen Teilen noch unverstanden. Für den Mechanismus der Glyoxysomenbildung werden mehrere Hypothesen diskutiert. Nach Goldman und Blobel (1978) werden die in der Microbody-Matrix lokalisierten Enzyme an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational in Microbody-Vorstufen transportiert, während membranassoziierte Enzyme an membrangebundenen Polysomen synthetisiert und via Membranfluß mit der Microbodymembran verschmelzen. Dagegen postulieren Lord und Bowden (1978) und Gonzales und Beevers (1976) die Glyoxysomenbildung als Sprossungsprozeß geeigneter Regionen des Endoplasmatischen Reticulums, in dessen Lumen die an membrangebundenen Polysomen synthetisierten Enzyme cotranslational sezerniert werden. Andererseits zeigen jüngste Versuche zur zellfreien Synthese von Microbody-Enzymen und "pulse-chase"-Experimente in vivo, daß sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Systemen die Biosynthese aller bislang untersuchter Matrix- und Membranenzyme über cytosolische Vorläufer-pools geregelt wird. In den meisten Fällen werden die Proteine als Monomere ohne Extrasequenz an freien Ribosomen synthetisiert. Dies gilt für Katalase (Goldman und Blobel, 1978; Robbi und Lazarow, 1982), Acyl-CoA-Oxidase, Crotonase/OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase (Furuta et al., 1982) aus Rattenleber, Isocitratlyase

aus Neurospora (Zimmermann und Neupert, 1980) und Ricinus-Endosperm (Roberts und Lord, 1981), Malatsynthase (Kruse et al., 1981) und Glykolatoxidase (Gerdes et al., 1982) aus Gurkenkotyledonen. Einzig Malatdehydrogenase scheint bisher mit einer Extra- bzw. Transitsequenz gebildet zu werden (Gietl und Hock, 1982, 1984; Riezman et al., 1980). Auch wenn eine selektive Aufnahme der cytosolisch produzierten Enzyme in Glyoxysomen in vitro nachgewiesen werden konnte, z.B. für Isocitratlyase (Zimmermann und Neupert, 1980), Malatsynthase (Kruse et al., 1981) und Malatdehydrogenase (Gietl und Hock, 1984), so ist doch der Mechanismus des Imports noch unbekannt. Nach Gietl und Hock (1984) wird die glyoxysomale prä-MDH an der Außenseite des Organells durch eine Processing-Protease gekürzt und nach dem Import zur reifen MDH gefaltet und dimerisiert.

Auch über Herkunft und Bildung der Membran der Glyoxysomen ist noch relativ wenig bekannt. Elektronenmikroskopische Befunde mit Kotyledonen von Wassermelonen zeigen, daß zu Beginn der Fettmobilisierung kleine Membranvesikel in den Zellen vorkommen, die bereits CAT enthalten. Im weiteren Verlauf wachsen sie in engem Kontakt mit den Lipid-bodies zu den pleomorphen Glyoxysomen heran, die für die Fettspeichergewebe vieler Ölsamenspezies typisch sind (Wanner et al., 1982).

Im Ricinus-Endosperm erfolgt der Abbau der glyoxysomalen Enzymaktivitäten nach Ablauf der Fettmobilisierung offenbar im Rahmen eines generellen, das gesamte Gewebe betreffenden Degenerationsprozesses, wodurch das Organell als Ganzes erfaßt wird und möglicherweise in cytoplasmatischen Vakuolen verdaut wird (Gerhardt und Beevers, 1970; Vigil, 1970).

Demgegenüber stellen die fettreichen ergrünenden epigäisch keimenden Kotyledonen ein Organ dar, das nicht wie das Ricinus-Endosperm lediglich nur Speicherfunktion hat, sondern nach der Fettmobilisierung als erstes photosynthetisch aktives Blattgewebe dient. Das heißt, die Glyoxysomen der Kotyledonen werden beim Ergrünen der Keimblätter in Blattperoxisomen mit vollkommen anderer stoffwechselphysiologischer Funktion umgewandelt. Dieser Differenzierungsschritt, der durch enzymatische Untersuchungen in mehreren Arten fettreicher Kotyledonen belegt ist (Zusammenfassung: Gerhardt, 1978; Beevers, 1979), führte zu drei Hypothesen. Nach der ersten "Zwei-Populations-Hypothese" gehen glyoxysomale und blattperoxisomale Funktion auf zwei unabhängige Populationen der Organellen zurück. Während beim Übergang der Kotyledonen zu photosynthetischer Aktivität Blattperoxisomen de novo vom ER abgesproßt werden, unterliegen nur die Glyoxysomen aus der heterotrophen Keimungsphase einem allmählichen, dem Vorgang im autolysierenden Ricinus-Endosperm entsprechenden Abbau (Kagawa und Beevers, 1975; Kagawa et al., 1975).

Nach einer Hypothese von Schopfer et al., (1976) unterliegen ganze Microbodies einem dauernden Umsatz. Durch Lichtinduktion werden Microbodies vom ER abgeschnürt, die einen sukzessiv höheren Anteil der peroxisomalen Enzymgarnitur beinhalten, bis nur noch reine Blattperoxisomen im Mesophyll dominant sind. Allerdings beeinflußt Licht weder die Fettmobilisierung noch den Abbau glyoxysomaler Enzymaktivitäten (Bajracharya und Schopfer, 1979).

Als Alternative wird von mehreren Autoren ein Wechsel der Enzymausstattung innerhalb einer einzigen Microbodypopulation vorgeschlagen, der durch selektive Inaktivierung bzw. Degradation glyoxysomaler Enzyme und gleichzeitiger Neusynthese peroxisomaler Enzyme ausgelöst wird (Frederick et al., 1975; Gerhardt und Betsche, 1976;

Theimer et al., 1975; Schuh und Gerhardt, 1984).

So konnten in Rohextrakten aus Flachs- (Khan, 1979) und Sonnenblumenkotyledonen (Theimer, 1976) der Nachweis über die Existenz eines spezifisch auf ICL gerichteten inaktivierenden Systems erbracht werden, das sein Aktivitätsmaximum zu einem Zeitpunkt entwickelt, an dem die glyoxysomalen Enzymaktivitäten aus dem Gewebe verschwinden. Bislang ist jedoch die subzelluläre Lokalisation und die Bedeutung dieses Inhibitors für die Regulation der Isocitratlyaseaktivität noch nicht bekannt. Neuere Ergebnisse an acetatadaptierten Aniszellsuspensionskulturen, in denen ICL und MS dereprimiert waren, ergaben, daß eine nachfolgende Glucosezufuhr in das Nährmedium ähnlich wie bei einigen Algen und Pilzen, den Verlust der Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des Glyoxylatweges aus den Glyoxysomen bewirkte, ohne daß dieser Vorgang von einer massiven Degradation des ganzen Organells begleitet wurde (Kudielka und Theimer, 1983). Dies würde einen spezifischen Mechanismus notwendig machen, mit dem gezielt glyoxysomale Enzyme abgebaut oder inaktiviert werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Modellsystem Zellkulturen die Regulation der Glyoxysomenbildung und -umwandlung bei einer höheren Pflanzenzelle mit biochemischen und immunologischen Methoden untersucht werden.

B. M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

1. Pflanzenmaterial

Für die Herstellung pflanzlicher Gewebekulturen wurde folgendes Saatgut verwendet:

- Brassica napus (Winterraps, Sorte "Lemkes Diamant")
- Coriandrum sativum L.
- Cucumis sativus L. (Chinesische Schlangengurken)
- Linum usitatissimum L.
- Pimpinella affinis L.
- Pimpinella anisum L.

Die Reinigung von Katalase und Isocitratlyase wurde mit Sonnenblumensamen (Vogelfutter), Herkunftsland Bulgarien, Erntejahr 1981, durchgeführt.

2. Nährmedien

Zur Kultivierung der Zellkulturen wurden folgende Nährmedien hergestellt:

- a) B5-Medium nach Gamborg et al., 1968: $5\mu\text{mol/l}$ 2,4D; pH 5,5; als Eisenquelle diente 10mg/l Sequestren (Ciba-Geigy).
- b) 4X-Medium nach Ulrich und Zenk, 1979: $10\mu\text{mol/l}$ 2,4D; $2,4\mu\text{mol/l}$ α -Naphthylelessigsäure; $0,9\mu\text{mol/l}$ 6-Furfurylaminopurin; $2,8\mu\text{mol/l}$ 3-Indolelessigsäure; pH 5,5; 10mg/l Sequestren; 2g/l N-Z-Amine (Otto Aldag GmbH, Hamburg).

- c) LS-Medium nach Linsmaier und Skoog, 1965: Es enthielt $1\mu\text{mol/l}$ 2,4D; $1\mu\text{mol/l}$ α -Naphthylelessigsäure; pH 6,0.

3. Anzuchtmethoden

3.1. Anzucht des Pflanzenmaterials

Das für die Herstellung der Zellkulturen vorgesehene Samenmaterial wurde zuerst 20min in 2%iger Natriumhypochloritlösung inkubiert, mit sterilem H_2O gewaschen und dann in 70%igem Alkohol nochmals oberflächensterilisiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde das sterile Samenmaterial auf feuchtem Zellstoff in Petrischalen bei 25°C im Dunkeln zur Keimung gebracht.

Sonnenblumensamen wurden vor der Aussaat 6h gewässert und 15min in einer 3g/l-Chinosollösung oberflächensterilisiert. Die Anzucht erfolgte auf feuchtem Vermikulit bei 25°C im Dunkeln.

3.2. Herstellung von pflanzlichen Gewebekulturen (Kalluskulturen)

Hypokotyle bzw. Endospermgewebe (*Ricinus communis*) der aseptisch gekeimten Pflänzchen wurden 2min lang in 2%ige Natriumhypochloritlösung getaucht, in sterilem H_2O gewaschen und in ca. 2-3mm große Stücke segmentiert. Die Explantate wurden sodann zur Feststellung des Optimalmediums auf die jeweils in der Phytohormonzusammensetzung unterschiedlichen Agarmedien (80g Agar/l Nährflüssigkeit) verteilt und im Dunkeln bei 28°C kultiviert. Nach erfolgter Kallusbildung (4 bis 8 Wochen) wurden die Gewebestücke auf Optimalmedium weiterhin passagiert.

3.3. Anzucht von Zellsuspensionkulturen

Zur Massenkultivierung wurde Kallusgewebe submers in Flüssigmedium kultiviert. Dazu wurden 200ml-Erlenmeyerkolben,

die mit je 50ml Nährmedium beschickt waren, mit brüchigen, leicht dissoziierenden Kallusstückchen angeimpft und in einem Klimaschrank (Braun Melsungen) bei 27°C und ca. 800 Lux Dauerlicht (Osram Natura, 20W) auf einem Rundschüttler (150 Upm) bewegt. Die Etablierung der Zellkultur erfolgte durch wiederholtes Passagieren im 7-Tage Rhythmus, indem jeweils 10% der Zellsuspension überimpft wurden. Größere Kulturansätze wurden in 21 Fernbach-Kolben (500ml Nährmedium) gehalten.

Acetat wurde in Form einer Natriumacetatlösung (1mol/l, pH 5,8) mittels Sterilfiltration (Porenweite 0,22µm) bis zu einer Endkonzentration von 0,01mol/l zugegeben, wobei das saccharosehaltige Nährmedium gegen saccharosefreies ausgetauscht wurde. Ebenso wurden Actinomycin D, Cycloheximid und PMSF als konzentrierte Lösungen durch Sterilfiltration appliziert.

4. Bestimmung der Wachstumsparameter

4.1. Zellernte

Die Zellaggregate wurden durch Filtration im Wasserstrahl-Vakuum in einer Porzellanfritte geerntet. Die gefilterte Nährflüssigkeit wurde von letzten Zelltrümmern durch 20000xg-Zentrifugation, 10min, gereinigt und für weitere Messungen aufbewahrt.

Nachdem die Zellen mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen worden waren, wurde das Frischgewicht bestimmt.

4.2. Bestimmung von pH und Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit der Nährlösung wurde mit einem Activion-Konduktometer, der pH-Wert mit einem Knick-Digital-pH-Meter bei konstanter Temperatur gemessen.

4.3. Bestimmung von Äpfelsäure und Zitronensäure

(Möllering, 1974; Möllering und Gruber, 1966)

Die Konzentration von Malat und Citrat im Nährmedium

wurde mit einer Testkombination (Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Probe wurde zuvor 1 : 10 verdünnt.

4.4. Bestimmung von Glucose (Werner et al., 1970)

Der Gehalt an Gesamtglucose in der Nährflüssigkeit wurde mit einer Glucoseoxidase/Peroxidase-Testkombination (Boehringer Mannheim) ermittelt: 50µl Nährmedium wurden mit 50µl 0,2mol/l K-Acetatpuffer pH 4,6 verdünnt und zur enzymatischen Spaltung der Saccharose mit 20µl 0,2%iger Invertaselösung versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3ml GOD/POD-Chromogengemisch zum Ansatz hinzugegeben und die Extinktion nach 30min bei 610nm gegen den Leerwert abgelesen. Als Standard diente eine 0,505mmol/l Glucoselösung.

4.5. Bestimmung der Zelldichte (Huber et al., 1978)

5ml der Zellsuspension wurden mit 1ml 90%iger TCA versetzt und nach 15min in einem Potter vorsichtig in Einzelzellen homogenisiert. Die Zellen wurden in einem Neubauer'schen Hämazytometer ausgezählt und in Zellen/ml Suspension hochgerechnet.

5. Präparation von Rohhomogenaten aus Zellsuspensionskulturen

Die Homogenisierung der Zellaggragate erfolgte bei 0°-5°C im Eisbad in einer Reibschale durch kräftiges Zerreiben mit vorgekühltem Pistill. Je Gramm Frischgewicht wurden 2ml Extraktionsmedium (0,15mol/l Tricine; pH 7,5; 0,5mol/l Saccharose; 10mmol/l KCl; 1mmol/l EDTA; 1mmol/l $MgCl_2$; 6mmol/l DTE) und 0,1g PVP zugegeben. Das Homogenat wurde durch sechs Lagen Gaze gepreßt und zur Abtrennung von Zelltrümmern und Einzelzellen bei 480xg 10min lang zentrifugiert. Der Überstand - im folgenden als Rohhomogenat (RH) bezeichnet - wurde zur Pelletierung der Zellorganelle bei 10000xg für 30min zentrifu-

giert. Das Sediment, das sich aus Mitochondrien, Proplastiden, Glyoxysomen, Membranen und anderen Partikeln zusammensetzt, wurde in 4ml Extraktionsmedium resuspendiert, gepottert und im folgenden als Rohpartikelfraktion (RPF) bezeichnet.

6. Dichtegradientenzentrifugation

Ein kontinuierlicher Saccharosedichtegradient wurde mit Hilfe eines Gradientenmixers aus 1ml 771,9g/l Saccharose als Kissen, 14ml 771,9g/l Saccharose und 15ml 338,1g/l Saccharose aufgeschichtet und mit 3ml der RPF beladen. Nach 45 minütiger Zentrifugation im Vertikalrotor (SV 288, Sorvall RC-5B) bei 40300xg wurden die Gradienten in 1,2ml Fraktionen gesammelt.

7. Messung der Enzymaktivitäten

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Messungen spektralphotometrisch mit Kontron Uvicon 810 bei Raumtemperatur durchgeführt.

7.1. Citratsynthase

(Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating) E.C.4.1.3.7.)
(Dixon und Kornberg, 1959)

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1ml:

Tris/HCl-Puffer, pH 8,0	0,1	mol/l
Acetyl-CoA	0,5	mmol/l
Oxalacetat	0,6	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Oxalacetat gestartet und bei 232nm verfolgt. Eine Extinktionsabnahme von $\Delta E = 0,1$ entspricht 9,35nmole Acetyl-CoA gespalten.

7.2. Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase)

(2-3-Hydroxyacyl-CoA-hydrolyase, E.C.4.2.1.17.)
(Steinmann und Hill, 1975)

Im Testansatz (1ml) waren enthalten:

Tris/HCl-Puffer, pH 7,4	0,3	mol/l
EDTA	5,0	mmol/l
Serumalbumin	0,4	mg/ml
Crotonyl-CoA	50	nmol/l
Enzymlösung	10	μ l

Die Abnahme von Crotonyl-CoA wurde bei 263nm verfolgt.

Der Extinktionskoeffizient beträgt $6,7 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.3. Fumarase

(L-Malate-hydrolyase, E.C.4.2.1.2.)

(Racker, 1950)

Der Testansatz (1ml) enthielt:

Tricine-NaOH-Puffer, pH 7,5	0,1	mol/l
Äpfelsäure	2,5	mmol/l
Triton X-100	0,1	g/l
Enzymlösung	20	μ l

Die Bildung von Fumarat wurde bei 240 nm verfolgt.

Der Extinktionskoeffizient ist $2,44 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.4. β -Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase

(Acyl-CoA: (Acceptor)oxidoreductase, E.C.1.3.99.3.)

(Nach Overath et al., 1967)

Im Testansatz waren enthalten (1ml):

Phosphatpuffer, pH 6,8	0,05	mol/l
EDTA	2,0	mmol/l
Rinderserumalbumin	1	g/l
NADH ₂	0,211	mmol/l
Acetoacetyl-CoA	0,12	mmol/l
Enzymlösung	20	μ l

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Acetoacetyl-CoA

gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340nm verfolgt.

Extinktionskoeffizient: $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.5. Isocitratlyase

(Threo-Ds-Isocitrate-Glyoxylate-Lyase, E.C.4.1.3.1.)

(Dixon und Kornberg, 1959)

Im Testansatz (1ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer, pH 7,4	85,0	mmol/l
MgCl ₂	5,0	mmol/l
DTE	4,0	mmol/l
Phenylhydraziniumchlorid	10,0	mmol/l
threo-Ds-Isocitrat	7,0	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde nach 5 - 10 minütiger Vorinkubation bei 324nm verfolgt.

Extinktionskoeffizient: $1,7 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.6. Katalase

(H₂O₂:H₂O₂-Oxidoreductase, E.C.1.11.1.6.)

(Lück, 1965)

Testansatz in 1ml Endvolumen:

Phosphatpuffer	0,1	mol/l
H ₂ O ₂	10,0	mmol/l

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl Enzymlösung gestartet und die Anfangsrate der H₂O₂-Zersetzung bei einer Meßstrahlung von 240nm verfolgt.

Der Extinktionskoeffizient betrug $3,9 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.7. Malatdehydrogenase

(L-Malate: NAD-Oxidoreductase, E.C.1.1.1.37.)

(Nach Ochoa, 1955)

Das Testgemisch enthielt in 1ml Endvolumen:

Phosphatpuffer, pH 7,5	0,1	mmol/l
NADH ₂	0,24	mmol/l
Oxalacetat	0,1	mmol/l
Enzymlösung		

Die Extinktionsabnahme wurde bei einer Meßstrahlung von 340nm verfolgt.

Extinktionskoeffizient: $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

7.8. NADH₂-Cytochrom c-Reduktase

(NADH₂: Ferricytochrome-c (b5)-Oxidoreductase, E.C.1.6.2.a)

(Lord et al., 1973)

Das Testgemisch enthielt in einem Endvolumen von 1ml:

Phosphatpuffer, pH 7,2	0,032 mol/l
Cytochrom c, oxidiert	0,5 g/l
NADH ₂	0,211mmol/l
KCN	5,0 mmol/l
Enzymlösung	10 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzymlösung gestartet und bei einer Wellenlänge von 550nm verfolgt.

Extinktionskoeffizient: $28,4 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

8. Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Protein wurde mit "Bio-Rad-Protein Dye Reagent Concentrate" im Micro-Assay-Verfahren bestimmt.

Eine Proteineichkurve wurde mit einer eingestellten Rinder Serumalbuminlösung ermittelt.

9. Bestimmung der Saccharosekonzentration

Die Saccharosekonzentration wurde durch Messung des refraktiven Index in einem geeichten Refraktometer (Fa. Atago) bestimmt und die jeweilige Dichte einer Eichtafel (Fa. ISCO) entnommen.

10. Enzymreinigung

Sämtliche Schritte der Enzymreinigung wurden bei 0-4°C ausgeführt.

10.1. Reinigung von Isocitratlyase

10.1.1. Präparation des Rohhomogenats (RH) - Acetonaufschluß

60g von drei Tage alten im Dunkeln gekeimten Sonnenblumenkotyledonen wurden sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen, 10min bei -18°C vorgekühlt und mit einem Ultraturrax (Typ T 45 N) in 300ml Aceton (-18°C) und 6g PVP 4 x 10sec lang zerkleinert. Der Niederschlag wurde abgenußt, mit 200ml eiskaltem Aceton nachgewaschen und am

Lyophilisator (WKF 205) zwei Stunden getrocknet. Das Acetonpulver wurde letztlich in 250ml Puffer E (150mmol/l Tricine/NaOH, pH 7,5; 1mmol/l EDTA; 5mmol/l DTE; 10mmol/l $MgCl_2$) rehydratisiert, durch 6-lagige Gaze filtriert und bei 20000xg 20min lang zentrifugiert.

10.1.2. Partielle Hitzedenaturierung

Das Rohhomogenat wurde in einem 60°C heißen Wasserbad 10min lang inkubiert und anschließend sofort im Eiswasser abgekühlt. Ausgefallenes Protein wurde bei 20000xg 20min abzentrifugiert.

10.1.3. Ammoniumsulfatfällung

Das hitzebehandelte Rohhomogenat wurde bis zu 40% mit Ammoniumsulfat gesättigt. Dazu wurden 0,243g $(NH_4)_2SO_4$ /ml unter ständigem Rühren zugegeben und nach erfolgtem Zusatz wurde das RH eine Stunde lang weitergerührt. Das Präzipitat wurde 20min bei 20000xg abzentrifugiert, in 20ml Puffer G (50mmol/l Tricine/NaOH, pH 7,5; 0,5mmol/l EDTA; 1mmol/l DTE; 10mmol/l $MgCl_2$) resuspendiert und zur Abtrennung nicht löslichen Proteins erneut 10min bei 20000xg zentrifugiert. Der ICL-angereicherte Überstand wurde über eine Sephadex G-200-Säule chromatographiert.

10.1.4. Chromatographie an Sephadex G-200

Die Säule (95 x 2,6cm) war mit Puffer G äquilibriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 13ml/h. Das Eluat wurde in Fraktionen von 5ml gesammelt. Die ICL-reichsten Fraktionen wurden gepoolt, mit $(NH_4)_2SO_4$ (40%ige Sättigung) präzipitiert, wie o.a. zentrifugiert und in D-Puffer (20mmol/l Tricine/NaOH, pH 7,7; 1mmol/l EDTA; 2mmol/l DTE; 5mmol/l $MgCl_2$) resuspendiert. Nach Dialyse über Nacht (2x Pufferwechsel) wurde das Dialysat nochmals zentrifugiert und der Überstand auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen.

10.1.5. Chromatographie an DEAE-Sephacel

Die Säule (20 x 2,5cm) war mit 80ml DEAE-Sephacel gefüllt und mit Puffer D äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 24ml/h. Das Eluat wurde in jeweils 3ml Fraktionen gesammelt und auf ICL-Aktivität untersucht.

10.2. Reinigung von Katalase

Die Präparation des Rohhomogenats, Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie über Sephadex G-200 wurde wie in 10.1. beschrieben ausgeführt. Infolge der Hitzeinstabilität von Katalase wurde auf partielle Hitzeinaktivierung verzichtet. Die Katalase-haltigen Fraktionen aus der Sephadex G-200-Säule wurden gepoolt, das Protein mit Ammoniumsulfat (50%ige Sättigung) ausgefällt und gegen Puffer K (10mmol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8) dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf eine Säule (1 x 10cm), die mit Bio-Gel HTP gefüllt und mit Puffer K äquilibriert war, aufgepumpt. Nach dem Waschen mit 6ml Puffer K wurde ein K-Phosphatgradient (10 - 200mmol/l) angeschlossen und in jeweils 3ml-Fraktionen (HTP I) bzw. 2ml-Fraktionen (HTP II) eluiert.

11. Platten-Gel-Elektrophorese in exponentiellen Polyacrylamid-SDS-Gelen

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein exponentieller Acrylamid-Gradient von 5 - 25% Acrylamid nach Mirault und Scherrer (1971) hergestellt. Die Probenvorbehandlung, die Herstellung des Kammerpuffers und des Obergels erfolgten nach Laemmli (1970). Es wurden jeweils 4-100µg Protein aufgetragen und bei 80V, 14h aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau geschah nach Weber und Osborn (1969).

12. Molekulargewichtsbestimmung

12.1. Bestimmung des Molekulargewichts der Enzymuntereinheiten

Jeweils 4µg der gereinigten Enzymproteine wurden in Laemmli-Puffer 1mln gekocht und auf SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Als Referenzproteine dienen Carboanhydrase, Ovalbumin, BSA und α -Gelatine (Fa. Serva). Auftrennung, Färben und Entfärben wurde wie in 11. beschrieben durchgeführt und anschließend die Laufstrecke der Proteine gegen den log der Molekulargewichte aufgetragen.

12.2. Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Enzyme

Das Molekulargewicht der gereinigten Enzyme wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G-200-Säule (95 x 2,6cm) ermittelt. Die Säule wurde zuvor mit 50mmol/l Tricine/NaOH-Puffer, pH 7,4; 200mmol/l KCl; 5mmol/l $MgCl_2$; 1mmol/l DTE äquilibriert. Als Eichsubstanzen wurden jeweils 4mg Ferritin, Katalase, Laktatdehydrogenase, BSA und Cytochrom c mit bekannten Molekulargewichten verwendet. Das Ausschlußvolumen wurde mit 2mg Dextranblau ermittelt. Der Verteilungskoeffizient, definiert als $K_{av} = \frac{V_E - V_O}{V_T - V_O}$, (V_T , Gesamtvolumen Gelpackung; V_E , Elutionsvolumen; V_O , Ausschlußvolumen) wurde gegen log Molekulargewicht aufgetragen.

13. Immunologische Methoden

13.1. Präparation der Antiseren

Vor der Immunisierung wurde das Serum jedes Kaninchens auf Fehlen einer Kreuzreaktion mit dem Antigen getestet, das injiziert werden sollte. Die Immunisierung wurde nach

der Methode von Hock (1974) vorgenommen: Jeweils 100µg Antigen in 0,5ml PBS-Puffer, pH7,4 wurden mit 0,5ml komplettem Freundschens Adjuvans (Behring) emulgiert. Die Emulsion wurde an mehreren Stellen in die Rückenhaut und unter die Nackenhaut injiziert. Diese Applikation wurde in einwöchigem Abstand, insgesamt 4 mal, wiederholt. Nach vier Wochen erfolgte eine Booster-Injektion ohne Freundschens Adjuvans. Sowohl in der 4. als auch in der 5. Woche wurde Blut aus der Ohrvene entnommen und die Gammaglobulin-Fraktion durch Fraktionierung des Serums mit Ammoniumsulfat gewonnen.

13.2. Immundiffusionstest (Ouchterlony, 1949)

Je 12ml verflüssigte Agarose (1%ig in 20mM Barbiturat-Puffer, pH 8,6; 0,02% NaN₃) wurden auf Glasplatten (8,2 x 9,3cm) verteilt. Nach Verfestigung der Agarose wurden mit Hilfe der Schablone aus dem Multiphor Immunelektrophorese-Kit (LKB) äquidistante Löcher um ein zentrales Auftragsloch gestant (2,5mm). Die zentrale Probenkammer wurde mit 10µl Rohhomogenat, die Außenlöcher mit je 10µl Antiserum aus einer Verdünnungsreihe gefüllt. Nach 24h Inkubation in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur wurden die Agaroseplatten zunächst 24h in 0,9%iger NaCl-Lösung, dann 1 Stunde in destilliertem Wasser gewässert. Anschließend wurden die Platten mit Filterpapier belegt, 30min gepreßt und bei 80°C getrocknet. Anfärben und Entfärben der Präzipitate wurde wie bei Polyacrylamid-Gelen durchgeführt.

13.3. Immunelektrophorese (Grabar und Williams, 1953)

Agaroseplatten wurden wie in 13.2. hergestellt. Die Auftragslöcher wurden mit Hilfe einer Schablone ausgestant und die Serumrinnen mit einem Skalpell markiert. Die Agaroseplatten wurden auf die Kühleinheit der LKB-Multi-

phor-Einheit luftblasenfrei so aufgelegt, daß die Probenkammern zum (+)-Pol gerichtet waren. Die Puffertröge wurden mit jeweils 11 0,02Mol/l Barbituratpuffer pH 8,6 gefüllt. als Strombrücke zwischen Gelplatte und Puffertröge wurden sechs Lagen Filterpapier verwendet. Nach Auftragen von 10µl Proben wurde die Elektrophorese bei 4°C und 20mA/Platte 3h lang durchgeführt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Serumrinnen ausgehoben, mit 100µl Antikörper aus einer Verdünnungsreihe gefüllt und in einer feuchten Kammer 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen und Fixieren der Präzipitate in 18%iger TCA wurden die Gelplatten wie in 13.2. beschrieben gepreßt und gefärbt.

13.4. Titration der Enzymextrakte mit Antikörper

Für die Hemmung der Enzymaktivitäten durch Antikörper wurde von Sonnenblumenkeimlingen ein Acetonextrakt, von Aniszellkulturen ein ammoniumsulfatgefällter (40%ige Sättigung) Extrakt hergestellt. Jeweils 200µl Extrakt wurden mit 50µl 0,5Mol/l NaCl und 50µl Kontrollserum, das steigende Konzentrationen an Antikörper enthielt, versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei Zimmertemperatur und gelegentlichem Schütteln wurde das entstandene Präzipitat abzentrifugiert und der Überstand auf ICL- und CAT-Aktivität untersucht.

13.5. ELISA (Engvall und Pearlmann, 1972)

13.5.1. Adsorption an Polystyren

Rohhomogenate aus Aniszellsuspensionskulturen wurden in PBS (50mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4; 0,9% NaCl) dialysiert. Jeweils 100µl Dialysat wurde in 1 : 2 Verdünnungsschritten in die Bohrungen der Mikrotiterplatte (Fa. Greiner) pipettiert und für 1h inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 5% BSA-Lösung und 0,2% Tween 80 in PBS

lh abgesättigt. Anschließend wurde ungebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween 80 entfernt.

13.5.2. Kompetitiver Immuntest

In jede Bohrungsreihe wurden 100µl Anti-ICL-Serum, entsprechend verdünnt in PBS - 0,5% BSA-Lösung, pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde mit PBS-Tween 80-Puffer überschüssiges Antiserum ausgewaschen und SAR-IgG-HRP (NEN) 2000-fach verdünnt in PBS, 0,5% BSA zugegeben. Nichtreagiertes Konjugat wurde wie oben beschrieben entfernt. Der Test der Peroxidaseaktivität wurde mit 100µl Substratgemisch, bestehend aus 1mmol/l ABTS (Boehringer), 0,03% H₂O₂, in 0,01mol/l K-Acetatpuffer, pH 5,0 ausgeführt. Nach 30min wurden die Proben 1 : 5 in Wasser verdünnt und die optische Dichte der Farbreaktion bei 405nm im Spektralphotometer gemessen.

13.6. Immunoblotting (Howe und Hershey, 1981)

Die Proben (100µg Protein) wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und nach der von Towbin et al. (1979) beschriebenen Methode auf Nitrocellulose (BA 83, Schleicher und Schüll) geblottet. Der elektrophoretische Transfer erfolgte 8h bei 28V in einer Trans-Blot-Zelle mit 8cm Elektrodenabstand. Zur Kontrolle des Elektrotransfers wurden die Proteinbanden auf dem Nitrocelluloseblatt angefärbt und wieder entfärbt (Schaffner und Weissmann, 1973). Absättigung freier Stellen auf der Nitrocellulose, sowie die Inkubation mit Antikörper, ¹²⁵I-Protein A wurde nach Howe und Hershey, 1981 durchgeführt. Die Antiserumverdünnung betrug hierbei 1 : 100, die Gesamtaktivität von ¹²⁵I-Protein A 2,5µCi. Für die Autoradiographie wurde ein medizinischer Röntgenfilm (X-Ray 90) benützt, der 1 bis 3 Tage auf die fixierte Nitrocellulose gepreßt wurde.

Als Alternative zum radioaktiven Nachweis der Enzymproteine wurde in einigen Versuchen die Detektion mit Peroxidase gekoppelten Antiantikörpern gewählt. Anstatt ^{125}I -Protein A wurden daher SAR-IgG-HPR (NEN) 1 : 2000 in 10mmol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 0,2% Lauroylsarkosin; 0,5% Triton X-100; 0,9% NaCl; 1% BSA verdünnt und 3h mit der Nitrocellulosemembran inkubiert. Danach wurde die Membran 4 x 10min mit o.a. Puffer, jedoch ohne BSA und 2 x 5min in K-Acetatpuffer, pH 5,0 gewaschen. Die Peroxidaseaktivität wurde sodann in 50ml K-Acetatpuffer, in dem 20mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol und 5 μ l 30%iges H_2O_2 gelöst waren, sichtbar gemacht.

C. E r g e b n i s s e

1. Wachstumsparameter

Um eine Vorstellung von den Veränderungen im Nährmedium während der Anzucht der Aniszellkulturen zu erhalten, wurden einige wichtige Wachstumsparameter bestimmt.

Bei Zellsuspensionskulturen wird trotz Konstanthaltung äußerer Bedingungen wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtstärke, Schüttelrate, Inokulationszahl und Zusammensetzung des Nährmediums, oft eine Unstimmigkeit der Wachstumsphase als Funktion der Zeit beobachtet (Hahlbrock, 1972). Zur exakten Bestimmung einer Kinetik ist es deshalb erforderlich, zum Zeitpunkt der Ernte und des Zellaufschlusses eine klare Definition der Wachstumsphase ermittelt zu haben. Als Wachstumsparameter eignen sich insbesondere solche, die schnell und einfach zu ermitteln sind. Abb.1 gibt den Verlauf der Kultivierung einer Aniszellkultur und die Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter wieder. Zu Versuchsbeginn wurden die Kulturgefäße mit $1,2 \times 10^5$ Zellen angeimpft und alle zwei Tage eine Probe entnommen.

Die Zellen treten nach kurzer Anlaufphase von zwei Tagen in logarithmisches Wachstum ein und erreichen nach 15 Ta-

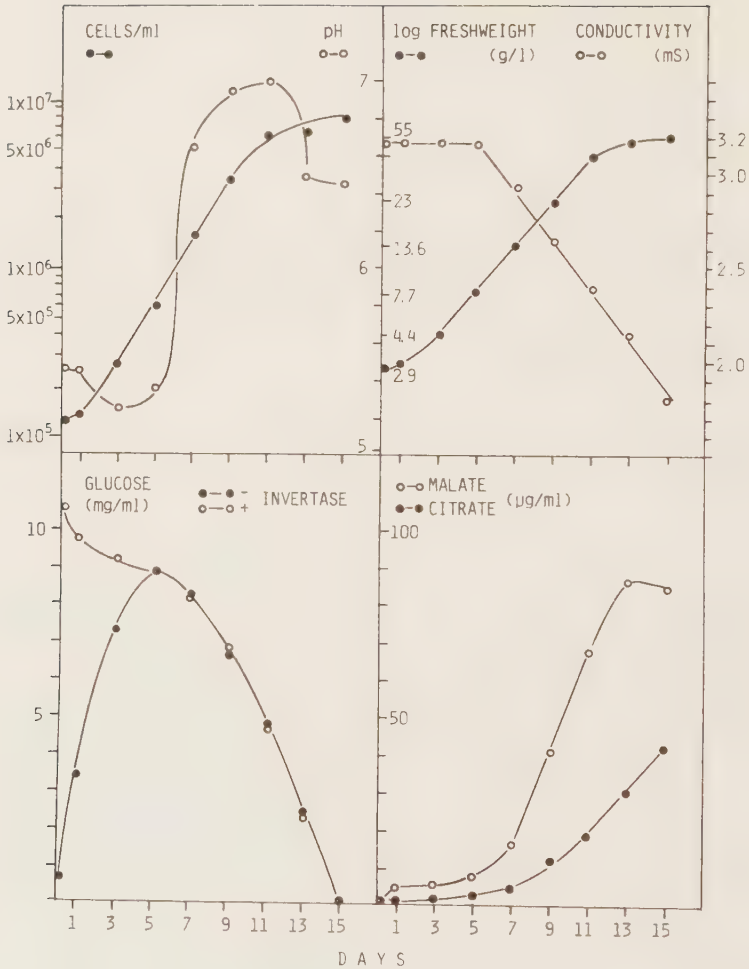


Abb.1: Beziehung zwischen Biomasse, Zellzahl, pH, Leitfähigkeit, Glucose-, Malat- und Citratkonzentration im Medium von Anis-Zellsuspensionskulturen während einer 15-tägigen Wachstumsperiode.

gen die stationäre Phase. Daraus ergibt sich eine Verdopplungszeit von 48h. Analog zur Zellvermehrung vergrößert sich das Frischgewicht. Der pH-Wert des Nährmediums fällt in den ersten fünf Tagen leicht ab, steigt dann aber zwischen dem 6. und 7. Tag drastisch an und erreicht am Tag 11 ein Maximum.

Das in den meisten Versuchen eingesetzte Nährmedium (Gamborg et al., 1968) enthält als C-Quelle Saccharose. Durch Hitzesterilisierung werden ca. 6% der Saccharose in Glucose und Fructose gespalten, so daß zu Beginn der Wachstumsphase auch nur 6% frei verfügbare Glucose vorliegt. Um aber den jeweiligen Gesamtgehalt freier und in Saccharose gebundener Glucose bestimmen zu können, wurden die Proben vor der Glucosebestimmung mit Invertase behandelt. Aus dem Diagramm geht hervor, daß die freie Glucose infolge der Zuckerhydrolyse durch die wachsenden Zellen bis zum 5. Tag zunimmt, was mit den Ergebnissen von Kato und Tsui (1981) übereinstimmt. Bis dahin werden auch nur 16% Glucose veratmet. Nach vollständiger Zuckerhydrolyse aber fällt der Glucosespiegel stark ab. Bemerkenswert ist der gleichzeitige Anstieg des pH-Wertes und der Beginn der linearen Leitfähigkeitsabnahme. Zum selben Zeitpunkt ist auch ein Anstieg von Malat und Citrat im Medium zu beobachten. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Zellaggregate zu Beginn des Wachstums Invertase ins Medium oder zumindest in ihre Zellwände sezernieren und daß durch aktive Ansäuerung dem Exoenzym ein physiologisches Optimum geschaffen wird.

2. Induzierbarkeit der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus bei verschiedenen Zellkulturen

In Zellsuspensionskulturen von Pimpinella anisum werden glyoxysomale Enzyme nach Entzug von Saccharose als C-Quelle exprimiert (Kudielka und Theimer, 1983; Lutzenberger und Theimer, 1983). Ein Vergleich der Enzymaktivitäten in den Glyoxysomen aus dereprimierten Anis-Zellkulturen mit denen im Anis-Endosperm zeigt aber, daß diese in ungefähr gleichen Größenordnungen vorkommen und beide Zelltypen einen identischen artspezifischen Microbody-Typ besitzen (Lutzenberger und Theimer, 1983).

Allerdings treten im Verlauf der Keimung anderer, fett-speichernder Samen Enzymaktivitäten auf, die, bezogen auf das Frischgewicht, die aus Aniszellkulturen bis zu 300-fach übersteigen. Daher sollte versucht werden, aus fett-mobilisierenden Keimlingen Zellkulturen herzustellen, die die Eigenschaft besitzen, während der Dereprimierung ähnlich hohe glyoxysomale Enzymaktivitäten zu induzieren, wie sie in den entsprechenden Ölsamen bei der Keimung beobachtet werden können.

Nährmedium (Optimalmedium)		
1B5 Gamborg et al., 1968	4B5 Ulrich u. Zenk. 1979	LS Linsmaier u. Skoog, 1965
Coriandrum sativum	Brassica napus	Cannabis sativa
Petroselinum hortense	Ricinus communis	Cucumis sativus
Pimpinella affinis		Linum usitatissimum
Pimpinella anisum		

Tab.1: Optimalnährmedien der hergestellten Zellsuspensionskulturen

2.1. Adaption der Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden wie in Material und Methoden beschrieben, entweder aus Hypokotylsegmenten oder aus Endospermgewebe hergestellt. Tab.1 gibt die optimalen Nährmedien wieder, in denen sich die Kulturen etablierten. Ansonsten unterlag die Anzucht aller Kulturen den gleichen Bedingungen.

2.2. Induktion von Isocitratlyase

Bei Wachstum der o.a. Zellkulturen in Nährmedien mit Saccharose als einziger C-Quelle konnte keine ICL-Aktivität gemessen werden. Umsetzen der Kulturen auf saccharosefreies, acetathaltiges Nährmedium führte jedoch zur Induktion von ICL. Aus Tab.2 ist zu ersehen, daß in allen Zellkulturen, mit Ausnahme von Petroselinum, Cucumis und Brassica, ICL-Aktivität induziert werden konnte. Allerdings liegen die Aktivitäten bedeutend niedriger als erwartet wurde. Geradezu bemerkenswert ist die Tatsache, daß Zellkulturen von Pflanzen, die bei der Samenkeimung ansonsten sehr hohe Enzymaktivitäten exprimieren, hier nur geringe oder sogar gar keine Enzyminduktion zeigten. In Linum-, Ricinus- und Cannabis-Zellkulturen findet sich im Rohhomogenat ebenfalls ICL-Aktivität, die aber offensichtlich im Cytoplasma nicht an ein bei 10000xg sedimentierbares Partikel gebunden vorliegt, während bei den "Umbelliferen"-Zellkulturen in saccharosefreiem 1B5-Medium auch partikuläre ICL-Aktivität vorkommt. Die Kultur von Pimpinella anisum besitzt aber deutlich höhere Enzymaktivitäten von Katalase und Isocitratlyase als alle übrigen untersuchten Zellkulturen.

	CAT μ kat/gFG		ICL nkat/gFG	
	RH	RPF	RH	RPF
PIMPINELLA ANISUM	15.3	5.0	1.0	0.7
PIMPINELLA AFFINIS	5.6	2.0	0.46	0.21
CORIANDRUM SATIVUM	5.3	3.7	0.4	0.2
LINUM USITATISSIMUM	1.6	0.85	0.82	0
RICINUS COMMUNIS	8.6	5.4	0.37	0
CANNABIS SATIVA	5.6	3.9	0.3	0
BRASSICA NAPUS	3.2	0.8	0	0
CUCUMIS SATIVUS	4.3	0.9	0	0
PETROSELINUM HORTENSE	1.7	0.5	0	0

Tab.2: Enzymaktivitäten im Rohhomogenat und Rohpartikelfraktion verschiedener Zellsuspensionskulturen, die 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen (10mmol/l) Nährmedium inkubiert wurden.

2.3. Katalase

Unabhängig davon, ob ICL induzierbar war oder nicht, konnte Katalase stets auch in der RPF nachgewiesen werden. Das Vorkommen von sedimentierbarer Katalaseaktivität in Zellkulturen, in denen keine ICL induziert wurde, läßt daher vermuten, daß diese über unvollkommen ausgerüstete Peroxisomen verfügen, wie sie auch bei der Samenreifung (Köller et al., 1979; Choinski und Trelease, 1978) beobachtet wurden.

3. Intrazelluläre Lokalisation von Enzymaktivitäten in verschiedenen Zellsuspensionskulturen

Anhand von Zentrifugation in Saccharosedichtegradienten sollte geprüft werden, in welchen Dichtebereichen die katalasehaltigen Strukturen und die induzierbare ICL sedimentieren und ob diese eventuell mit anderen glyoxysomalen Enzymen assoziiert sind.

3.1. Cucumis sativus (Abb.2)

Die Auftrennung der Zellorganellen von Cucumis-Kulturen, die 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen Medium inkubiert wurden, ergab im SDG das in Abb.2 dargestellte Enzymverteilungsmuster. Bei einer Dichte von 1,235kg/l zeigt sich ein ausgeprägter Aktivitätsgipfel von Katalase. Dieser Dichtebereich ist für Microbodies höherer Pflanzen typisch. Cytochrom c-Reduktase (CCR) ist in zwei Banden vertreten. Ein Maximum fällt mit der Mitochondrien andeutenden Fumarase (FUM) zusammen und der zweite Aktivitätsgipfel bei einer Dichte von 1,11kg/l ist sehr wahrscheinlich auf Membranen des Endoplasmatischen Retikulums zurückzuführen. Isocitratlyase-Aktivität konnte allerdings in keiner Fraktion gemessen werden.

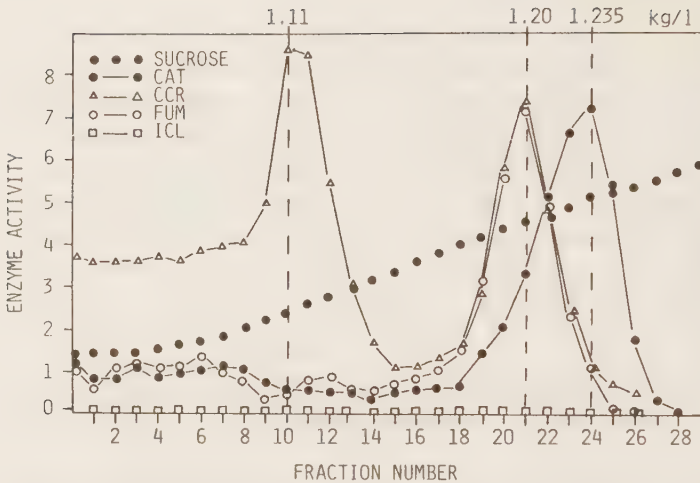


Abb.2: Verteilung der Enzymaktivitäten aus dem Rohhomogenat von *Cucumis sativus* - Zellkulturen im SDG. Die Kulturen wurden für 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen Medium inkubiert.

Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT	0,10	μkat/gFG
CCR	0,25	μkat/gFG
FUM	0,12	nkat/gFG

3.2. *Linum usitatissimum* (Abb.3)

Wurden Rohhomogenate von dereprimierten *Linum*-Zellkulturen im SDG aufgetrennt (Abb.3), so konnten sowohl CAT-Aktivitäten als auch Aktivitäten von ICL gemessen werden. CAT sedimentiert bei einer Dichte von 1,24kg/l und ist mit dem Hauptpeak von β -Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase

(HAD) koinzident. ICL konnte in diesem Dichtebereich nicht nachgewiesen werden, sondern ausschließlich im Überstand des Dichtegradienten wiedergefunden werden. Dieser Befund spricht dafür, daß zwar, ähnlich wie bei Cucumis-Kulturen, Microbodies in der Zelle vorhanden sind, aber glyoxysomale Funktionen, nämlich Fettmobilisierung und Acetatverwertung, nicht wahrnehmen können.

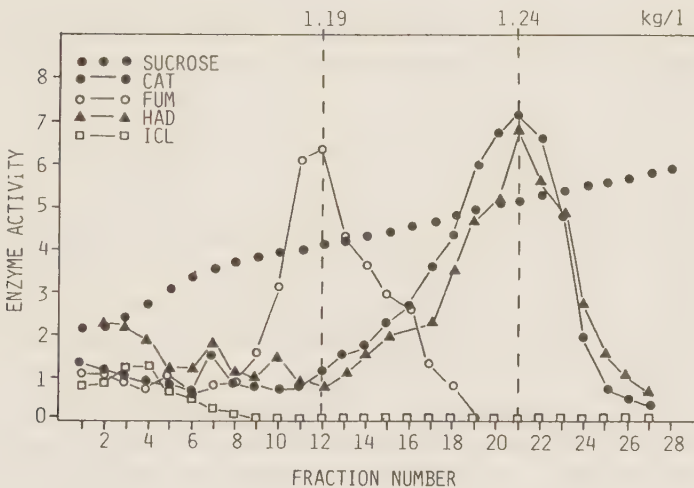


Abb.3: Verteilung der Enzymaktivitäten aus dem Rohhomogenat der *Linum usitatissimum*-Zellkultur im SDG, die für 72h in saccharosefreiem Nährmedium inkubiert wurde.
Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT	0,025	µkat/gFG
FUM	0,050	nkat/gFG
HAD	0,025	nkat/gFG
ICL	0,025	nkat/gFG

3.3. Ricinus communis (Abb.4)

Das Verteilungsmuster der Enzymaktivitäten im SDG von Ricinus-Zellkulturen, die 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen Nährmedium inkubiert wurden, entsprach im Profil dem, wie es von Linum-Kulturen erhalten wurde. Das Leitenzym CAT hat zusammen mit den β -Oxidations-Enzymen HAD und Crotonase (CROT) bei 1,24kg/l ein Aktivitätsmaximum. HAD und CROT zeigen aber bei 1,14kg/l noch kleinere Aktivitätspeaks und scheinen hier membrangebunden vorzuliegen. ICL-Aktivität wurde in der Microbodyfraktion nicht gefunden, sondern war nur im Überstand des Gradienten nachweisbar.

3.4. Coriandrum sativum (Abb.5)

Ein augenfälliger Unterschied zu den Ergebnissen aus der Dichtegradientenzentrifugation der Rohhomogenate von Cucumis-, Linum- und Ricinus-Zellkulturen ergab sich bei dereprimierten Coriandrum sativum-Kulturen. Der Aktivitätsgipfel von CAT wird nicht wie bei den oben beschriebenen Kulturen bei einer Dichte von 1,24kg/l gefunden, sondern koinzidiert exakt mit dem Mitochondrien-Markerenzym FUM bei 1,18kg/l. In der gleichen Bande tritt auch die Hauptaktivität der induzierten ICL auf, während im Bereich des CCR-Hauptgipfels keine weitere Aktivitätsmaxima festgestellt werden konnten.

Das gleiche Enzymverteilungsmuster resultierte bei reprimierten Zellkulturen, die in saccharosehaltigem Nährmedium kultiviert werden. ICL-Aktivität konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Daten könnten einerseits darauf hinweisen, daß in diesen Zellkulturen ein Peroxisomentyp gebildet wird, der abweichend von dem der meisten höheren Pflanzen eine geringere Dichte besitzt und mit den Mitochondrien ko-sedimentiert. Andererseits kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die ansonsten in Microbodies auftretenden Enzyme in diesem Falle in Mitochondrien lokalisiert sind.

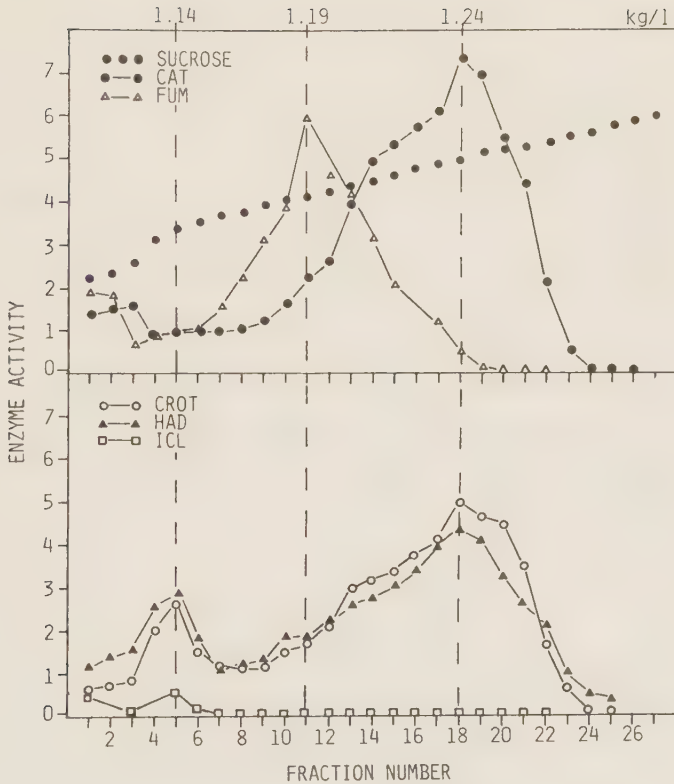


Abb.4: Verteilung der Enzymaktivitäten aus dem Rohhomogenat von Ricinus-Zellkulturen im SDG. Die Zellsuspensionskultur wurde für 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen Nährmedium inkubiert.

Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT, HAD	0,100	μ kat/gFG
CROT, FUM	0,200	nkat/gFG
ICL	0,025	nkat/gFG

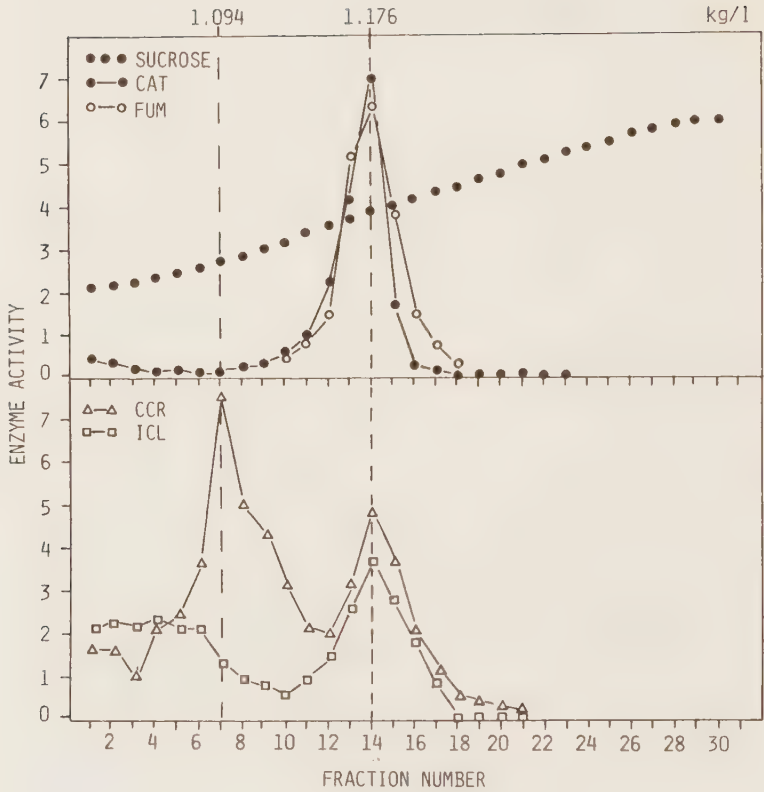


Abb.5: Verteilung der Enzymaktivitäten aus dem Rohhomogenat von *Coriandrum sativum*-Zellsuspensionskulturen im SDG. Die Kulturen waren 48h in saccharosefreiem Nährmedium inkubiert. Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT	0,14	μ kat/gFG
FUM	0,50	nkat/gFG
CCR	0,60	μ kat/gFG
ICL	0,01	nkat/gFG

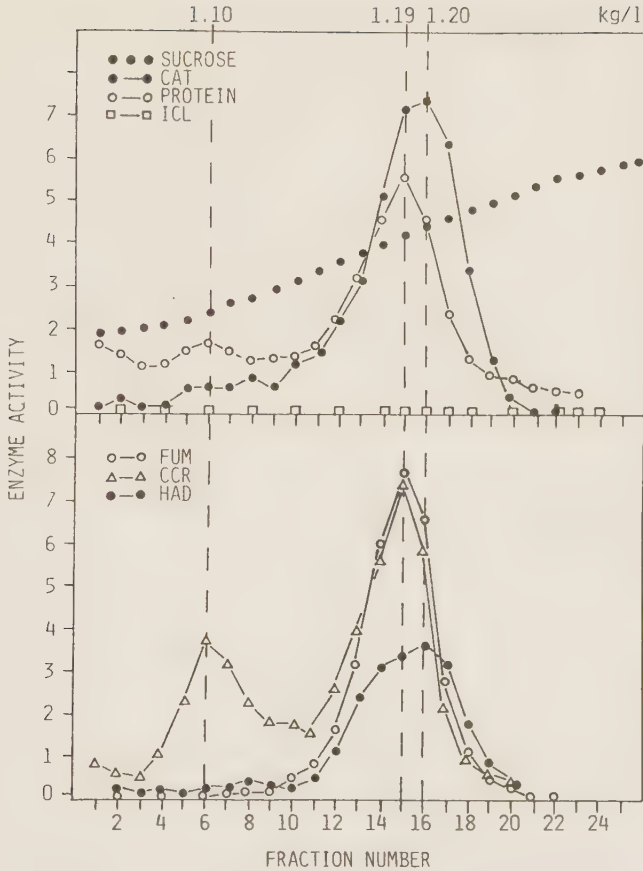


Abb.6: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der RPF einer *Pimpinella affinis* - Zellkultur im SDG, die in saccharosehaltigem Nährmedium kultiviert wurde.
Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
Protein	0,10	mg/ml
CAT	0,07	μ kat/gFG
FUM	0,10	nkat/gFG
CCR	0,10	μ kat/gFG
HAD	0,03	nkat/gFG

3.5. *Pimpinella affinis* (Abb.6 und 7)

Ein ähnliches Enzymverteilungsmuster im SDG wie das von *Coriandrum*-Kulturen wurde nach Auftrennung der Organellen aus der RPF von reprimierten *Pimpinella affinis*-Zellkulturen erhalten (Abb.6). Auch hier überlappen die Aktivitätsgipfel von Mitochondrien anzeigenden Enzymen wie FUM und CCR mit den normalerweise peroxisomalen Enzymen CAT und HAD bei einer Dichte von 1,19 - 1,20kg/l.

ICL konnte, wie erwartet, nur gemessen werden, wenn die Kulturen 72h in saccharosefreiem Nährmedium gehalten wurden; dann aber sedimentierte sie zusammen mit CAT und mitochondrialen Enzymaktivitäten bei einer Dichte von 1,19kg/l (Abb.7).

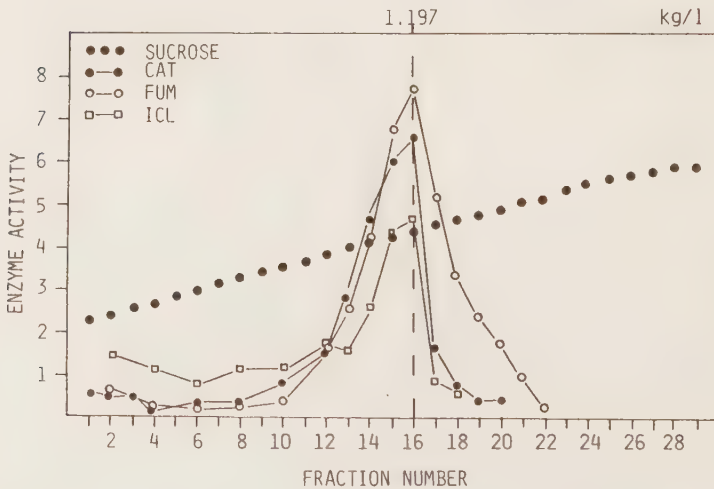


Abb.7: Verteilung der Enzymaktivitäten aus der RPF von *Pimpinella affinis* - Kulturen nach Saccharosedichtegradienten (SDG) - Zentrifugation. Die Kulturen wurden 72h in saccharosefreiem Medium inkubiert.
Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT	0,10	μkat/gFG
FUM	0,12	nkat/gFG
ICL	0,04	nkat/gFG

3.6. Pimpinella anisum (Abb.8 und 9)

Die bisher am besten untersuchte Zellsuspensionskultur hinsichtlich der Regulation und Biogenese von Microbodies ist Pimpinella anisum (Kudielka et al., 1981; 1983). So konnte von Kudielka (1983) gezeigt werden, daß durch die Präsenz von Kohlenhydraten im Nährmedium die Expression der Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, Isocitratlyase (ICL) und Malatsynthase (MS), unterdrückt wird, Katalase aber, das Markerenzym der Microbodies, nach Zentrifugation der Organellen im SDG ausschließlich in Dichtebereichen (1,13kg/l) vorkommt, wo normalerweise Membranen des Endoplasmatischen Reticulums sedimentieren. Die CAT-haltigen Vesikel wurden als Microbody-Vorläufer diskutiert, die im Verlauf der Dereprimierung zu funktionellen Glyoxysomen reifen. Es sollte daher geklärt werden, ob neben Katalase auch weitere glyoxysomale Enzyme, insbesondere die der β -Oxidation, in diesen "leichten" Vesikeln lokalisiert sind und wie sich diese im Verlauf der Dereprimierung durch Saccharoseentzug im SDG offenbaren.

Abb.8 gibt das Enzymverteilungsprofil im SDG wieder, in dem die Rohpartikelfraktion von Anis-Kulturen zentrifugiert wurde, die 6 Tage in Saccharose-Medium kultiviert worden war. Das mitochondriale Markerenzym Fumarase hat bei 1,19kg/l einen ausgeprägten Aktivitätsgipfel. In dieselbe Bande fällt auch das Maximum der Citratsynthase- und Malatdehydrogenaseaktivität, beides Enzyme, die in Mitochondrien lokalisiert sind. Eine typische Bande für Glyoxysomen, die bei einer Dichte von etwa 1,22 - 1,26 kg/l liegen müßte, wurde nicht beobachtet. Dagegen überlappen die Aktivitätsgipfel der glyoxysomalen Markerenzyme Katalase, Crotonase und β -Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase eng mit der Mitochondrienbande und sedimentieren in einer Dichte von 1,20kg/l. Malatdehydrogenase und Citratsynthase, die gleichermaßen glyoxysomale wie mito-

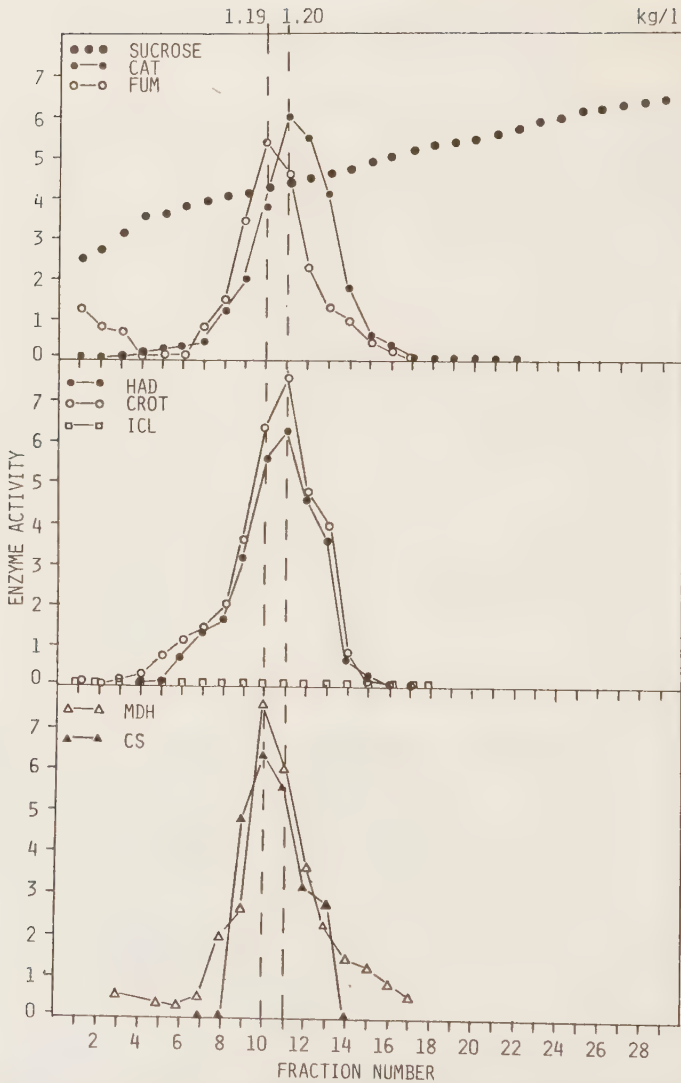


Abb.8: Verteilung von Enzymaktivitäten nach Zentrifugation einer RPF von Anis - Zellkulturen in SDG, die in saccharosehaltigem Medium kultiviert wurden.
Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
FUM	0,17	nkat/gFG
CAT	0,06	μkat/gFG
HAD	0,05	nkat/gFG
CROT	0,25	nkat/gFG
MDH	1,00	nkat/gFG
CS	0,01	nkat/gFG

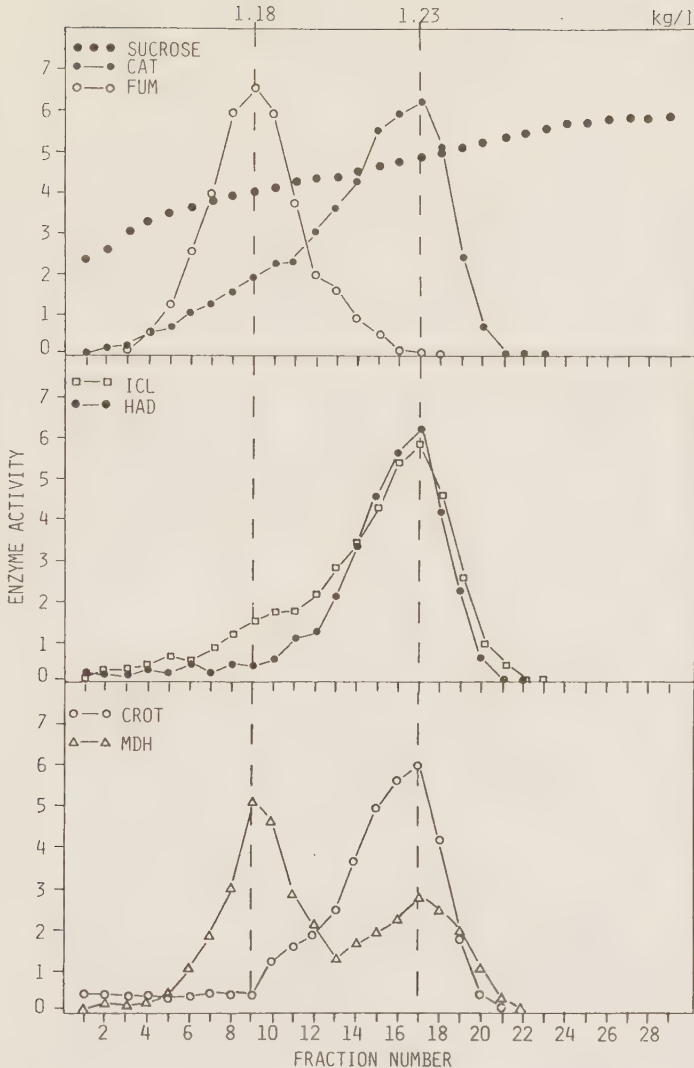


Abb.9: Verteilung der Enzymaktivitäten im kontinuierlichen SDG nach Zentrifugation der RPF aus Anis - Zellkulturen, die für 48h in saccharosefreiem, acetathaltigen Medium inkubiert wurden.
Eine Einheit entspricht für:

Saccharose	103,8	g/l
CAT	0,180	µkat/gFG
FUM	0,100	nkat/gFG
ICL	0,025	nkat/gFG
HAD	0,150	nkat/gFG
CROT	0,900	nkat/gFG
MDH	0,600	nkat/gFG

chondriale Enzyme sind, finden sich ebenfalls in dieser Bande. Isocitratlyaseaktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach Zentrifugation der RPF von Aniszellkulturen, welchen für 48h 10mmol/l Acetat als einzige Kohlenstoffquelle zugegeben worden war, ergab sich im Dichtegradienten ein Verteilungsmuster der Markerenzyme, das von dem der unbehandelten Kulturen deutlich verschieden war (Abb.9).

Die Aktivitätsmaxima von FUM und MDH fallen in einer Bande bei 1,18kg/l zusammen und repräsentieren offenbar die Mitochondrienbande. MDH zeigt einen weiteren Aktivitätsgipfel bei einer Dichte von 1,23kg/l, bei der auch CAT angereichert ist. Hier ist eine deutliche Trennung der mitochondrialen und glyoxysomalen MDH-Aktivität zu erkennen. Die Enzyme der β -Oxidation haben ebenfalls in dieser für Glyoxysomen typischen Dichte von 1,23kg/l Aktivitätsgipfel, in der auch ICL sedimentiert, die in unbehandelten Kulturen noch nicht nachweisbar war.

Aus den bisherigen Befunden geht hervor, daß für weitere Untersuchungen zur Biogenese von Microbodies und Regulation glyoxysomaler Enzyme sich die Aniszellkultur aus folgenden Gründen am besten eignet:

1. In reprimiertem Zustand sind möglicherweise Präglyoxysomen vorhanden, die Katalase sowie Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren, aber keine ICL-Aktivität aufweisen.
2. Nach Dereprimierung durch Saccharoseentzug kann nach der Auftrennung der Organellen im Saccharosedichtegradienten eine Verlagerung der vermuteten Präglyoxysomen in höhere Dichten (1,20 - 1,23kg/l) beobachtet werden. Gleichzeitig findet sich ICL in den nun "reifen" Glyoxysomen.

4. Verlauf der Entwicklung von Isocitratlyase- und Katalaseaktivität bei Anis-Zellkulturen

Im folgenden wurde der Verlauf der Entwicklung von ICL- und CAT-Aktivität nach Umsetzen der Kultur in Induktionsmedium (saccharosefreies, acetathaltiges Nährmedium) untersucht. Die Zellkultur befand sich zum Zeitpunkt "0" im 6.Tag der Wachstumskurve und der pH-Wert der Nährflüssigkeit betrug 6.0.

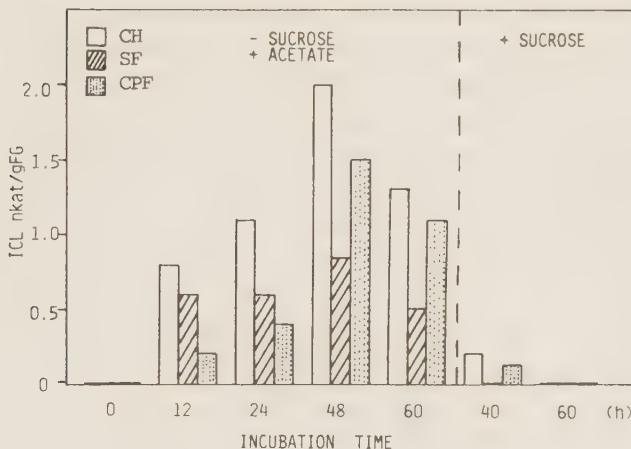


Abb.10a: Verlauf der Entwicklung von Isocitratlyase in Rohhomogenat (CH), Cytoplasma- (SF) und Rohpartikelfraktion (CPF) von Aniszellsuspensionskulturen, die 60h im saccharosefreien, acetathaltigen (10mmol/l) und anschließend 60h im saccharosehaltigen Nährmedium inkubiert wurden.

Im Verlauf der Inkubation wurde ICL induziert und erreichte nach 48h ein Aktivitätsmaximum (Abb.10a). Nach 60h wurde das Induktionsmedium durch frisches, saccha-

rosehaltiges Medium ausgetauscht und weitere 60h inkubiert, um die substratbedingte Reprimierung der Enzymaktivitäten zu überprüfen. Wie Abb.10a deutlich zeigt, ist in der Cytoplasmafraktion nach 40h keine ICL-Aktivität mehr vorhanden und nach 60h sogar in allen Fällen auf 0 gesunken. Anzumerken sei die Tatsache, daß die Enzymaktivität in der Cytoplasmafraktion sofort ein hohes Niveau erreicht und im weiteren Verlauf der Induktion keine bedeutende Änderung erfährt, im nachfolgenden Reprimierungsschritt aber sehr schnell unter die Meßgrenze abfällt. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, daß möglicherweise zuerst ein cytoplasmatischer ICL-Pool aufgebaut wird und daraus die glyoxysomale ICL angereichert wird. Ebenso scheint der Ort der Inaktivierungsphase zuerst im Cytoplasma lokalisiert zu sein.

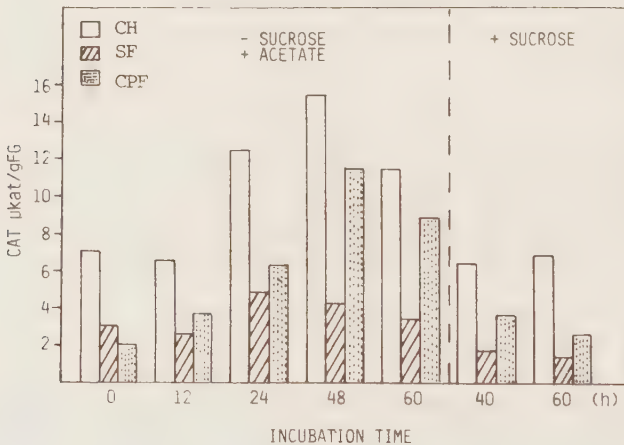


Abb.10b: Verlauf der Entwicklung von Katalase in Rohomogenat (CH), Cytoplasma- (SF) und Rohpartikelfraktion (CPF) von Anis-zellsuspensionskulturen, die 60h im saccharosefreien, acetathaltigen (10mmol/l) und anschließend 60h im saccharosehaltigen Nährmedium inkubiert wurden.

Die Katalaseaktivität wird infolge der Inkubation in Induktionsmedium um 50% gesteigert (Abb.10b). Erneute Zugabe von saccharosehaltigem Medium führt zu einer Abnahme der Aktivität, die sich auf den Ausgangswert einpendelt. Das saccharose-abhängige Auftreten bzw. Verschwinden der glyoxysomalen Enzymaktivitäten bei der Anis-Zellkultur deutet auf einen Regulationsmechanismus hin, bei dem vermutlich Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels eine Rolle spielen, wie er bisher auch bei Pilzen (Flavell und Woodward, 1971; Romano und Kornberg, 1969), Algen (Harrop und Kornberg, 1966; Syrett et al., 1963) und Protozoen (Lord et al., 1974) beschrieben worden ist.

Das Verschwinden der ICL-Aktivität erfordert entweder eine selektive Inaktivierung des Enzyms oder gar einen geregelten proteolytischen Abbau des Enzymproteins. Um diese Frage biochemisch untersuchen zu können, mußten zuerst Antiseren gegen Isocitratlyase und Katalase gewonnen werden, mit denen die beiden Enzymproteine, die in den Zellkulturen nur in geringer Konzentration vorkommen, eindeutig nachgewiesen werden können.

5. Enzymreinigung

Eine Reinigung der ICL und CAT aus dereprimierten Anis-zellkulturen erschien aufgrund der bedeutend niedrigeren Enzymaktivitäten und damit Enzymkonzentrationen als ungeeignet. Sonnenblumenkeimlinge besitzen dagegen am 3. Keimungstag mehr als die 50-fache Enzymaktivität, wie aus Abb.11 deutlich hervorgeht. Außerdem war nach bisherigen Erfahrungen eine Kreuzreaktion der Antikörper gegen die Sonnenblumen-Enzyme mit den Anis-Enzymen zu erwarten (Hock, persönliche Mitteilung).

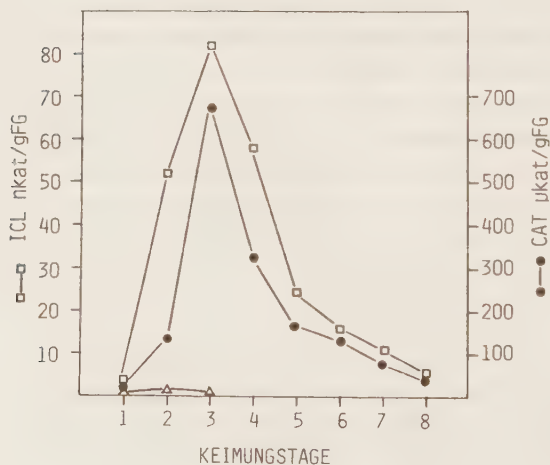


Abb.11: Entwicklung der Aktivitäten von ICL und CAT in Kotyledonen von *Helianthus annuus* im Verlauf der Keimung.
 Δ — Δ ICL-Aktivität im RH von Anis-Zellkulturen.

Zur Enzymreinigung und anschließenden Antikörperproduktion wurden daher drei Tage alte Sonnenblumenkeimlinge verwendet.

5.1. Reinigung von Isocitratlyase

Der Ablauf und Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Gesamt- aktivität (nkat)	Gesamt- protein (mg)	Spez. Aktivität (nkat/mgP)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Acetonfällung = RH (20.000g Überstand)	248.0	1686.4	3075.2	0.55	1.0	100.0
Partielle Hitze- denaturierung	234.0	1380.6	1848.6	0.75	1.4	81.9
Ammoniumsulfat- fällung 40%	19.5	1244.1	157.9	7.90	14.4	73.8
U ₃	255.0	127.5	1402.5	0.09		
Chromatographie über Sephadex G-200 (pool)	18.0	385.2	19.8	19.40	35.3	22.8
Chromatographie über DEAE- Sephacel (pool)	9.0	101.1	3.6	28.10	51.0	6.0

Tab.3: Reinigung von ICL aus Kotyledonen drei Tage alter Helianthus annuus-Keimlinge

5.1.1. Herstellung von Acetonpulver

Als Extraktionsmethode erwies sich ein Gewebeaufschluß der Kotyledonen mit eiskaltem Aceton als besonders zweckmäßig, da in einem Arbeitsgang sowohl das im weiteren Reinigungsverlauf störende Fett, als auch ein Teil der Fremdproteine entfernt wurden. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Lagerhaltung des Acetonpulvers in N_2 -Atmosphäre bei $-20^{\circ}C$ bis zum Gebrauch. Dabei war die ICL-Aktivität über mehrere Wochen stabil.

Das Acetonpulver wurde in Puffer aufgelöst, bei 20000xg das unlösliche Material abzentrifugiert und auf eine Proteinkonzentration von 12,4mg/l eingestellt. Diese Lösung wird als Rohhomogenat bezeichnet.

5.1.2. Hitzebehandlung

Zur weiteren Entfernung von Fremdprotein, aber vor allem zur Inaktivierung ICL-spezifischer Proteasen (Theimer, 1976; Khan et al., 1979; Giachetti et al., 1982; Surendranathan, 1978) wurde das Rohhomogenat einer Hitzebehandlung unterzogen.

Wie in Abb.12 illustriert, wird durch 15-minütige Inkubation bei $60^{\circ}C$ 55% des Gesamtproteins präzipitiert.

Die ICL-Aktivität sinkt in den ersten 5 min sehr rasch auf 78%, bleibt dann aber relativ stabil, so daß sogar nach 40 min noch 60% der ursprünglichen Aktivität erhalten ist, während Katalase nach 15-minütiger Hitzebehandlung nur noch 1% der Ausgangsaktivität zeigt.

Natriumoxalat, das als Stabilisator für ICL-Aktivität in Homogenaten gilt (Colonna und Mc Fadden, 1975; Schmid-Neuhaus, 1978), hatte bei der Sonnenblumen-ICL keinen Einfluß. Für die ICL-Reinigung wurde stets 10 min bei $60^{\circ}C$ inkubiert. Dies ergab eine 1,4-fache Anreicherung der ICL und eine Präzipitation der CAT auf 1/5 der Gesamtaktivität.

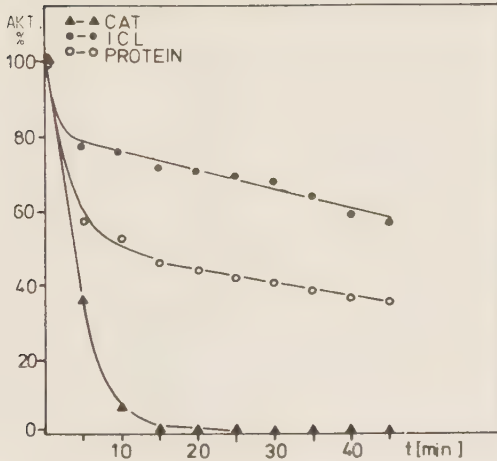


Abb.12: Einfluß der Temperatur (60°C) auf ICL- und CAT-Aktivität im acetongefällten Rohextrakt von 3 Tage alten, im Dunkeln gekeimten Sonnenblumenkotyledonen.

5.1.3. Ammoniumsulfatfällung

Durch 40%-ige Sättigung des hitzebehandelten Rohhomogenats mit Ammoniumsulfat wurde die ICL-Aktivität von 90% des Fremdproteins abgetrennt und fast vollständig präzipitiert. Dies bedeutet eine ca 14-fache Anreicherung. Im 20000xg Überstand konnten lediglich noch Spuren von ICL-Aktivität nachgewiesen werden. Zur weiteren Reinigung wurde der aufgenommene Niederschlag dann durch Säulenchromatographie weiter aufgetrennt.

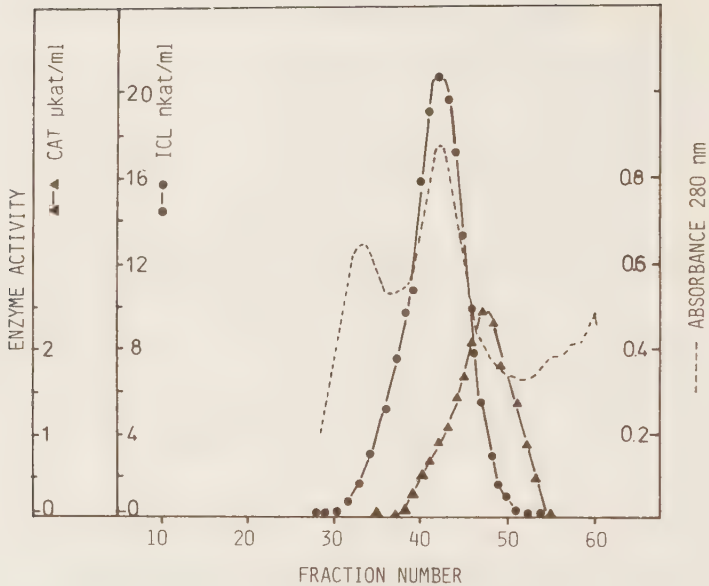


Abb.13: Chromatographie von ICL und CAT nach Hitzedenaturierung und Ammoniumsulfatfällung über Sephadex G-200.

5.1.4. Gelfiltration

Abb.13 zeigt die Chromatographie von ICL und CAT auf Sephadex G 200. Aus der Proteinverteilung ist zu ersehen, daß ICL neben dem Ausschlußprotein den Hauptproteinanteil bildet und Katalase aufgrund der Hitzeeliminierung keinem eigenen Proteinpeak zuzuordnen ist. Die Fraktionen höchster ICL-Aktivität wurden gesammelt, das Protein mit Ammoniumsulfat ausgefällt und dialysiert.

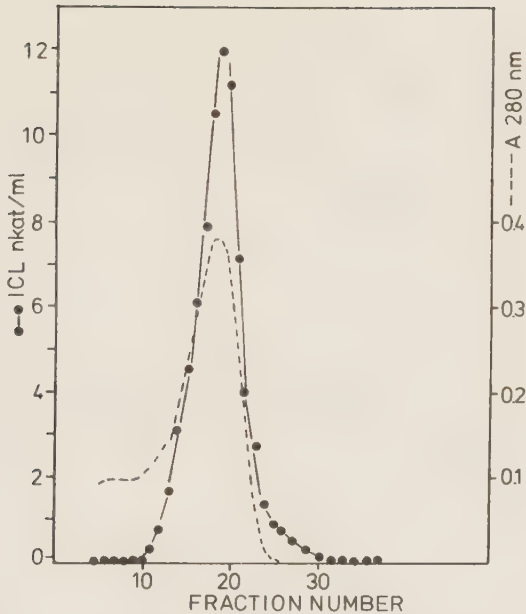


Abb.14: Chromatographie von ICL über DEAE-Sephacel.

5.1.5. Chromatographie an DEAE-Sephacel (Abb.14)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Khan et al. (1977), Lamb et al. (1978) und Frevert und Kindl (1978) wurde ICL in der Anionenaustauschersäule nicht zurückgehalten, sondern bereits mit dem Waschvolumen eluiert. Ähnliches konnten auch Malhotra und Srivastava (1982) und Vanni (1979) bei der Reinigung von ICL aus *Ricinus-Endosperm* bzw. *Pinus pinea* beobachten. In der weiteren Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,0 - 0,2mol/l) konnte keine ICL-Aktivität gemessen werden. Die vereinigten Fraktionen mit der höchsten Aktivität enthielten 3,6mg Protein und eine spezifische Aktivität von 28nkat/mg Protein. Dem entspricht ein Anreicherungsfaktor von 51,0 und eine Ausbeute von 6%.

5.2. Reinigung von Katalase

Der Ablauf und Erfolg der Reinigung ist in Tabelle 4 zusammengefaßt. Mit Ausnahme der partiellen Hitzedenaturierung waren die ersten drei Reinigungsschritte der ICL-Reinigung analog.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Gesamt- aktivität (μ kat)	Gesamt- protein (mg)	Spez. Aktivität (μ kat/mgP)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Acetonfällung = RH (20.000g Überstand)	335	21700	4254.5	5.1	1.0	100.0
Ammoniumsulfat- fällung 40%	15	16750	865.5	19.3	3.8	77.0
U ₃	365	4025	2920.0	1.4		
Chromatographie über Sephadex G-200-Säule (FR 42-48)	35	12880	70.0	184.0	36.0	59.0
Chromatographie über HTP-Säule I (FR 14-22)	27	5745	21.6	266.0	52.0	26.5
Chromatographie über HTP-Säule II (FR 50,51,52)	6	1266	3.0	422.0	83.0	5.8

Tab.4: Reinigung von CAT aus Kotyledonen von 3 Tage alten Sonnenblumen-Keimlingen.

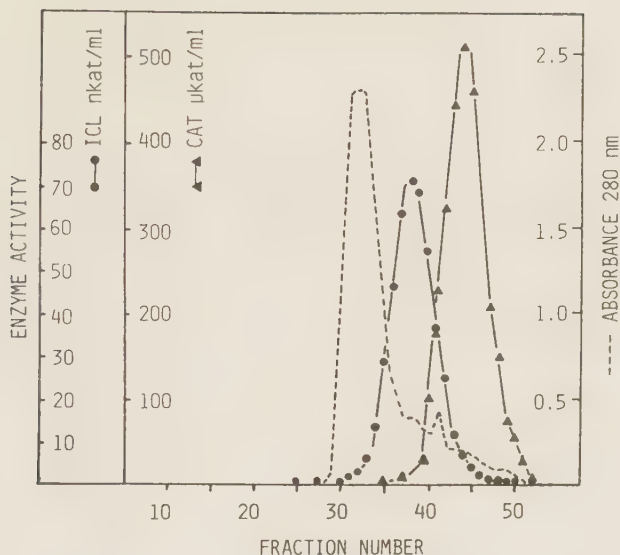


Abb.15: Chromatographie von CAT und ICL nach Ammoniumsulfat-fällung (40%) auf Sephadex G-200.

Durch Chromatographie über Sephadex G-200 wurde eine 36-fache Anreicherung erzielt, wobei bis dahin nur 41% der Gesamtaktivität verloren ging (Abb.15). Eine deutliche Trennung von ICL konnte durch Gelfiltration nicht erreicht werden. Bei Chromatographie über Biogel-HTP wurde aber der größte Teil der kontaminierenden ICL gebunden, so daß nur ca 1% der ursprünglichen ICL-Aktivität beim Spülen der Säule mit einem linearen Kaliumphosphatgradienten zusammen mit CAT eluiert wurde. Die Abtrennung der Restkontamination erfolgte über einen zweiten Säulenlauf (Abb.17). Bei einer Phosphatkonzentration von 60 mmol/l wurde CAT von der Säule abgelöst und hatte eine spezifische Aktivität von 422µkat/mg Protein. Dies entspricht einer 83-fachen Anreicherung.

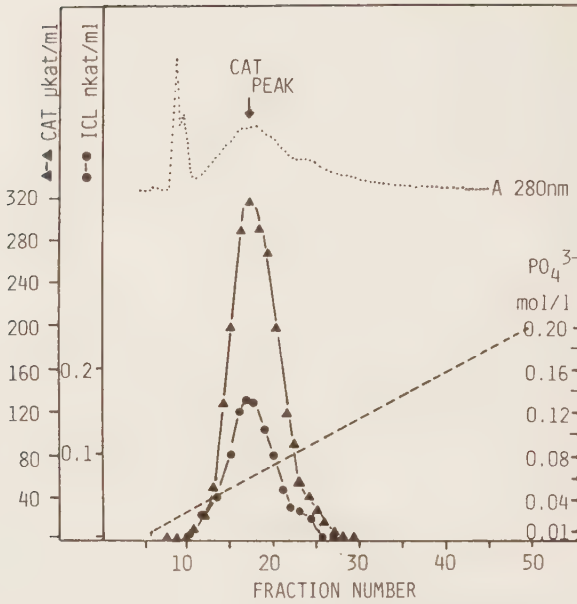


Abb.16: Chromatographie von Katalase über Bio-Gel HTP I.

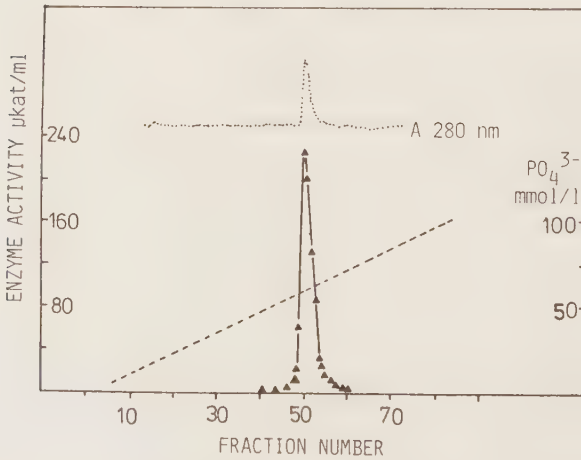


Abb.17: Chromatographie von Katalase über Bio-Gel HTP II.

5.3. Homogenität der gereinigten Enzyme Katalase und Isocitratlyase

Die Reinheit der isolierten Enzyme wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestätigt. Nach Chromatographie über DEAE- bzw. Biogel-HTP-Säulen zeigen die gesamten Fraktionen höchster ICL- und CAT-Aktivität im Elektropherogramm nur mehr jeweils eine einzige Proteinbande. Die Bahnen a - g in Abb.18 geben die Proteinmuster der verschiedenen Fraktionen im Verlaufe der Enzymreinigung wieder.

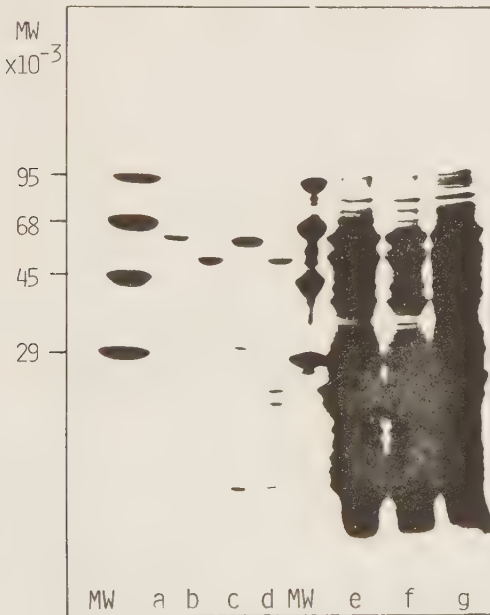


Abb.18: Gel-Elektropherogramm verschiedener Enzymfraktionen während der Reinigung von ICL und CAT aus Sonnenblumenkotyledonen.

- a: ICL aus DEAE-Sephacel-Peak-Fraktion
- b: CAT aus Bio-Gel HTP II-Peak-Fraktion
- c: ICL-haltiger Pool von Sephadex G-200-Säule
- d: CAT-haltiger Pool von Sephadex G-200-Säule
- e: Ammoniumsulfatfällung
- f: Partielle Hitzedenaturierung
- g: Acetonextrakt
- MW: Eichproteine

5.4. Molekulargewicht von Katalase und Isocitratlyase

Die Molekulargewichte der isolierten Enzyme wurden durch Gelfiltration über eine mit Standardproteinen geeichte Sephadex G-200-Säule bestimmt. Abb.19 zeigt das Diagramm von K_{av} gegen $\lg M_r$, wobei jeweils die Mittelwerte aus zwei Versuchen aufgetragen wurden. Für Katalase ergibt sich daher ein apparentes Molekulargewicht von 220.000, für Isocitratlyase 325.000.

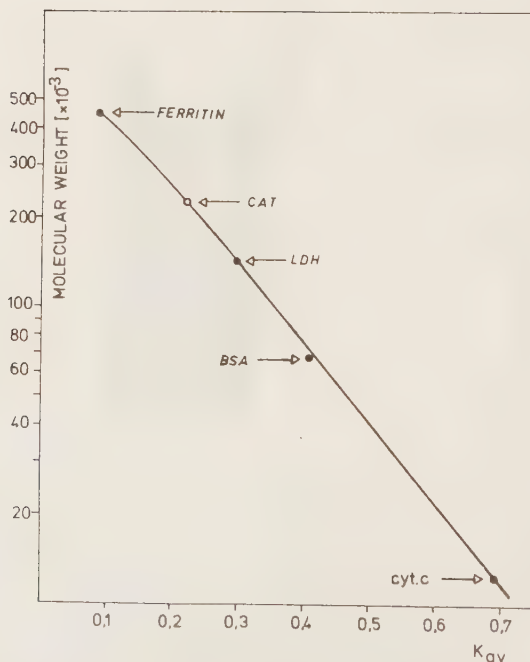


Abb.19a: Molekulargewichtsbestimmung von CAT durch Gelfiltration über Sephadex G-200.
Molekulargewicht der Referenzproteine:
CYT c, 12500; BSA, 68000; LDH, 145000; Ferritin, 450000.

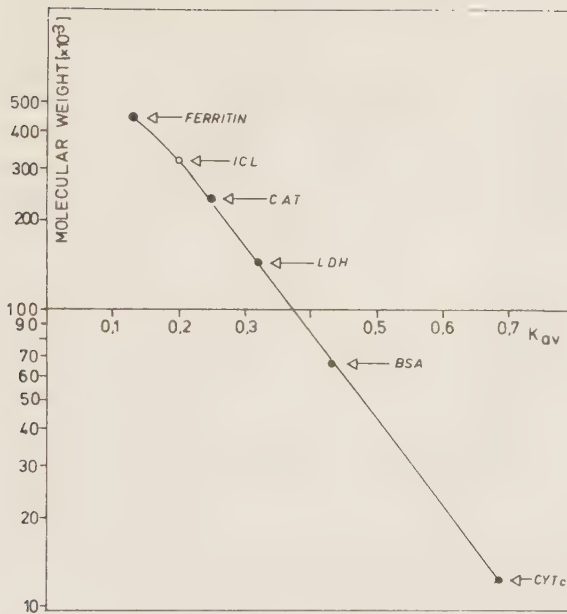


Abb.19b: Molekulargewichtsbestimmung von ICL durch Gel-filtration über Sephadex G-200
Molekulargewicht der Referenzproteine:
CYT c. 12500; BSA, 68000; LDH, 145000; Ferritin, 450000.

5.5. Molekulargewicht der Untereinheiten von Katalase und Isocitratlyase

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten wurden Proben der gereinigten Enzyme über SDS-PAGE (Mirault und Scherrer, 1971) aufgetrennt. Als Referenz diente eine "Calibration-Protein-Kit". Wie aus Abb.20 zu ersehen ist, beträgt das Molekulargewicht der

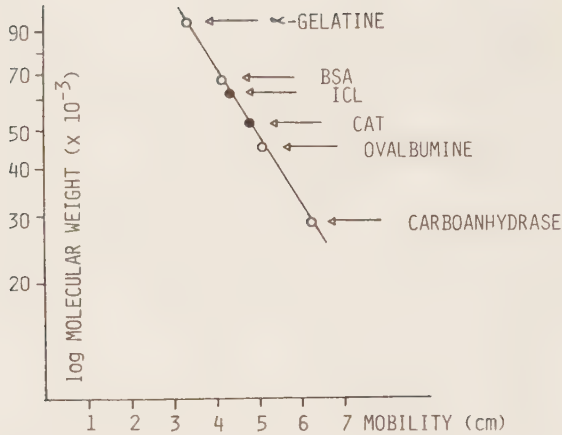


Abb.20: Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten von ICL und CAT über SDS-PAGE.

Molekulargewichte der Referenzproteine:

Carboanhydrase 29000

Ovalbumin 45000

BSA 68000

α-Gelatine 95000

Untereinheiten von Katalase 52500, das der Isocitratlyase 62000. Diese Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus sechs Bestimmungen. Damit ergibt sich für CAT ein Proteinmolekül aus vier gleichartigen Monomeren. Isocitratlyase jedoch scheint offensichtlich ein pentameres Protein zu sein, was nach den bisher gefundenen Daten sehr ungewöhnlich ist, da sie meist als tetrameres Oligopeptid beschrieben wurde (Frevert und Kindl, 1978; Khan et al., 1977; Reiss und Rothstein, 1974; Malhotra und Srivastava, 1981). Lediglich Lamb et al. (1978) konnten bei Cucumis sativus ebenfalls ein pentameres Isocitratlyaseprotein nachweisen.

5.6. Kinetische Daten von Isocitratlyase

Gereinigte Isocitratlyase aus Sonnenblumenkotyledonen zeigt in K-Phosphat- und Imidazolpuffer ein breites pH-Optimum von pH 7.4 - 7.7. Unterhalb pH 7 sinkt die Enzymaktivität auf ca. 50%. Diese Daten stimmen mit denen von Frevert und Kindl (1978) an Cucumis sativus gewonnenen Ergebnissen gut überein.

Die Aktivität von ICL ist von bivalenten Metallionen abhängig. Absolut notwendig sind Mg^{2+} -Ionen. Sie steigern die Aktivität erheblich. Bereits ab 2mmol/l $MgCl$ ist eine Sättigung erreicht. Ebenso sind Thio-Verbindungen für maximale ICL-Aktivität erforderlich, die bei Zugabe von 2mmol/l DTE erreicht wird. DTE ist durch Mercaptoethanol (gleiche Molarität entsprechender SH-Gruppen) ersetzbar.

Als K_m -Wert wurde für die ICL aus Sonnenblumen 1,25mmol/l ermittelt. Er liegt somit deutlich über den für andere Gewebe gefundenen, wo Werte von 0,039mmol/l (Lamb et al., 1978) bis 0,28mmol/l (Khan et al., 1977) bestimmt wurden.

	ICL	CAT
Molekulargewicht nativ	325000	220000
Molekulargewicht Untereinheit	62000	52500
Anzahl der Unter- einheiten	5	4
pH-Optimum		
in Phosphatpuffer 0,1M	7.7	--
in Tricin-NaOH 0,1M	7.7	--
in Imidazol-HCl 0,1M	7.7	--
Mg^{2+}	2mmol/l	--
DTE	2mmol/l	--
K_m	1.25mmol/l (threo-D-Isocitrat)	--

Tab.5: Kinetische Eigenschaften von ICL und CAT aus Sonnenblumen.

5.7. Antiserencharakteristik

5.7.1. Monospezifität der Antiseren

Zum Nachweis der Spezifität der Antiseren wurde einerseits die klassische Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (1953), andererseits der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1949) durchgeführt. Ein weiteres Kriterium für die Monospezifität der Antiseren war die Immunoblotting-Methode.

Die Immunelektrophoresen (Abb.21a,b) von CAT und ICL zeigen nur eine einzige Präzipitationslinie, welche die Monospezifität der Antiseren und damit die Homogenität der Antigene zeigt.



Abb.21a: Immunelektrophorese von gereinigter ICL aus Helianthus annuus.

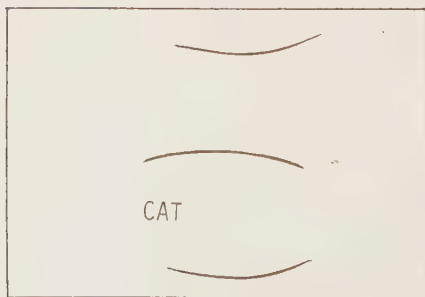


Abb.21b: Immunelektrophorese von gereinigter CAT aus Helianthus annuus.

Auch im Doppeldiffusionstest, bei dem der zentral applizierte Rohextrakt gegen eine abnehmende Antikörperkonzentration diffundiert, zeigt sich infolge der Monospezifität nur eine einzige Präzipitationsbande (Abb.22a/b). Darüberhinaus lassen auch die Ergebnisse aus den Immunoblottingversuchen, in denen Rohhomogenate elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Antiseren inkubiert wurden, sowohl für Anti-Katalase- als auch für Anti-ICL-Serum auf Monospezifität schließen.

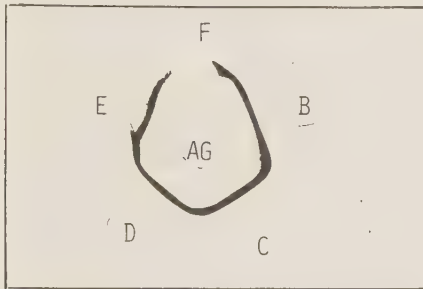


Abb.22a: Immundiffusionstest von Sonnenblumen-Acetonextrakt gegen CAT-Antiserum. AG, Acetonextrakt; B - F, Antiserumverdünnung 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32.

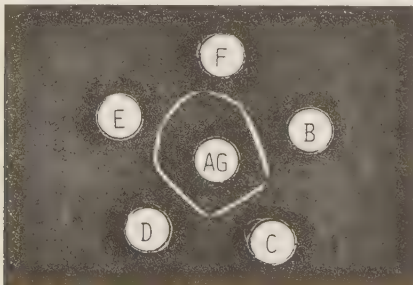


Abb.22b: Immundiffusionstest von Sonnenblumen-Acetonextrakt gegen ICL-Antiserum. AG, Acetonextrakt; B - F, Antiserumverdünnung 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32.

5.7.2. Immunologische Beziehung zwischen ICL und CAT aus *Helianthus annuus*-Kotyledonen und Aniszellkultur

Da Antiseren gegen ICL und CAT aus den Aniszellkulturen wegen der nicht realisierbaren Reinigung der Enzyme aus Zellkulturen nicht verfügbar waren, sollte versucht werden, mit Hilfe der gegen Sonnenblumen-Enzyme gerichteten Antiseren ICL und CAT in den Extrakten der Aniszellkulturen nachzuweisen. Dafür müßten folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Identität der Enzymproteine:

Im Immundiffusionstest sollten die Präzipitationsbanden zwischen den Antigenen unterschiedlicher Herkunft und dem Antiserum ineinander übergehen und nur eine Präzipitationsbande ergeben.

2. Die Enzymaktivitäten von ICL und CAT sollten bei Titration der Enzymproteine mit Antiserum fast vollkommen inaktiviert werden.

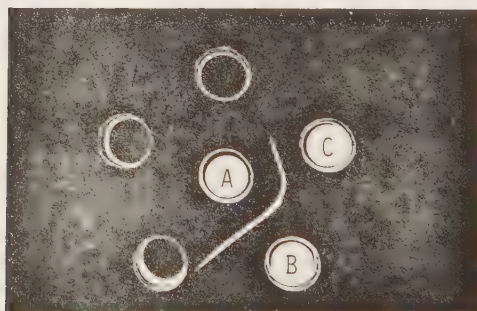


Abb.23a: Immundiffusionstest: Vergleich der Immunreaktion der gereinigten ICL aus *Helianthus* und der in der Ammoniumsulfatfällung von dereprimierten Aniszellkulturen.

A Antikörper gegen ICL aus Kotyledonen von *Helianthus annuus*

B ICL aus *Helianthus annuus*-Kotyledonen

C Ammoniumsulfatfällung vom Rohextrakt aus dereprimierten Aniszellkulturen (48h -Saccharose, +10mmol/l Acetat)

Die Homologie zwischen ICL bzw. CAT aus Aniszellkulturen und Sonnenblumenkotyledonen zeigt Abb.23a und 23b. Da die gebildete Präzipitationslinie keine Spornbildung aufweist, kann davon ausgegangen werden, daß die jeweiligen Enzymproteine zum größten Teil oder sogar vollkommen identisch sind.

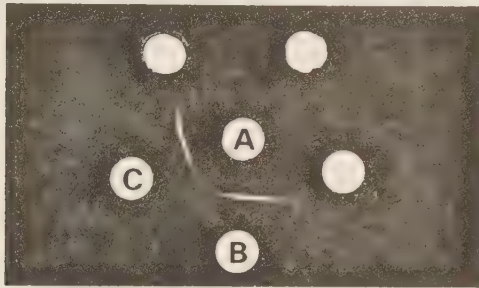


Abb.23b: Immundiffusionstest: Vergleich der Immunreaktion der gereinigten CAT aus Helianthus und der in der Ammoniumsulfatfällung von dereprimierten Aniszellkulturen.

A Antikörper gegen CAT aus Kotyledonen von Helianthus annuus

B CAT aus Helianthus annuus-Kotyledonen

C Ammoniumsulfatfällung vom Rohextrakt aus dereprimierten Aniszellkulturen (48h -Saccharose, +10mmol/l Acetat)

Abb. 24 veranschaulicht die zunehmende Inaktivierung der Enzymaktivitäten bei steigender Antikörperzugabe zum Inkubationsansatz. Es ist ersichtlich, daß speziell ICL aus Zellkulturen mit Anti-ICL-Serum maximal präzipitiert werden kann, was als weiterer Hinweis für die Homologie der ICL-Enzymproteine gelten kann. Allerdings bleiben ca. 23% der CAT-Aktivität nach der Titration erhalten. Dies mag entweder auf nichtantigenes CAT-Protein oder aber auf unspezifische H_2O_2 abbauende Reaktionen im Enzymtest zurückzuführen sein.

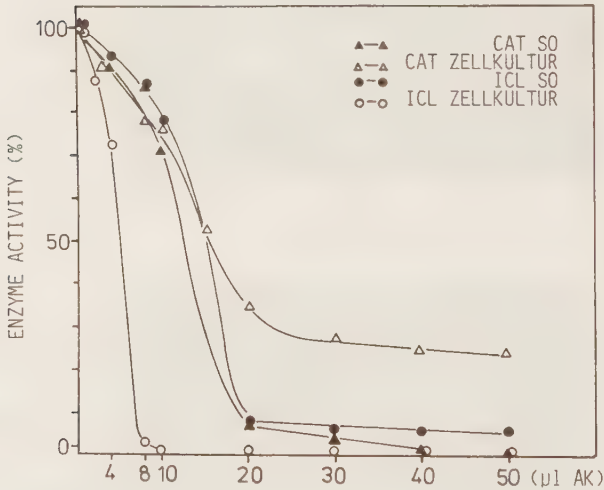


Abb.24: Inaktivierung der Enzymaktivitäten durch Titration mit Antiserum

6. Induktion und Repression von Isocitratlyase in Aniszellsuspensionskulturen

In Kapitel 4 wurde der Verlauf der Entwicklung der Aktivitäten von ICL und CAT in den Aniszellkulturen dargestellt, nachdem die Induktion glyoxysomaler Enzymaktivitäten durch Saccharoseentzug ausgelöst wurde.

Die Frage nach der Art der Regulation dieser Enzyme, des Transports in die Glyoxysomen sowie der Mechanismus des Abbaus bzw. der Inaktivierung konnte allerdings nicht beantwortet werden.

Der Einsatz monospezifischer Antikörper sollte deshalb zur Klärung dieser Fragen beitragen.

6.1. ELISA: Visualisierung von ICL

Der ELISA-Test bietet eine empfindliche Methode zum Nachweis von Enzymproteinen in Rohextrakten mit Hilfe monospezifischer Antikörper. Dadurch können sowohl inaktive wie aktive Enzymproteine in nativem und denaturiertem Zustand erfaßt werden. Die Anwendung des ELISA-Test erlaubt daher auch die Bestimmung von eventuell inaktiven ICL-Proteinen in Extrakten aus Zellkulturen, die in Saccharose-Medium kultiviert wurden. Als Kontrolle diente das Rohhomogenat einer Aniszellkultur, die 72h in saccharosefreiem Nährmedium inkubiert wurde und eine ICL-Aktivität von 1,6kat/gFG hatte. Die Proben wurden hinsichtlich des Proteingehalts ausgeglichen und davon jeweils 100µl in 1 : 2-Verdünnungsschritten in die Löcher der Mikrotiterplatten pipettiert. Alle weiteren Schritte sind in Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abb.25 dargestellt.

Bei steigender Gesamtproteinmenge des Rohhomogenats dereprimierter Zellkulturen und Erhöhung des Antiserumtiters wird eine lineare Steigerung der Absorption bis ca.

170µg/ml Gesamtprotein erreicht. Die sehr geringe Absorption, die von Rohextrakten reprimierter Zellkulturen erhalten wurde, ist auf unvermeidbare, unspezifische Bindungen der Immunglobuline an Proteine im Rohextrakt zurückzuführen. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß in den Zellsuspensionskulturen, die auf saccharosehaltigem Medium gewachsen sind, mit dem ELISA-Test serologisch kein ICL-Protein nachzuweisen ist, wohl aber bei Zellen, die 72h ohne Saccharose gehalten wurden. Dies würde darauf hindeuten, daß nach Saccharoseentzug eine "de novo"-Synthese von ICL stattfindet.

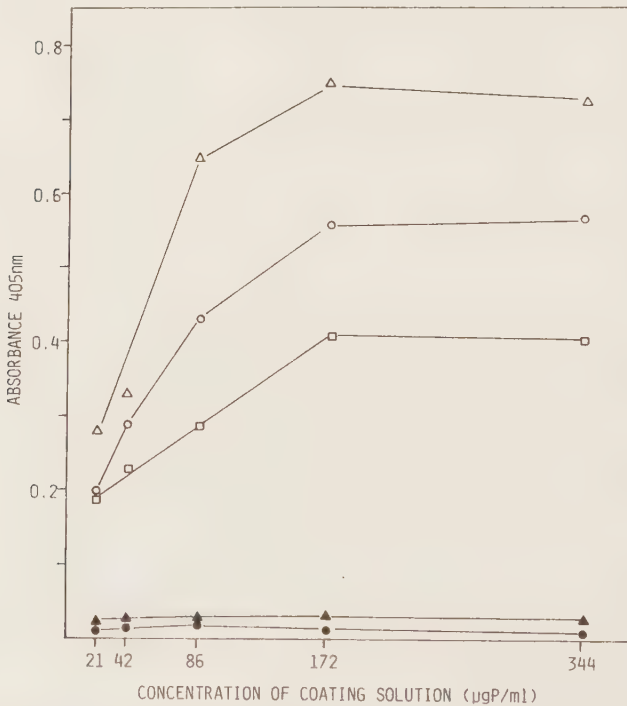


Abb.25: ELISA; Titration von Rohhomogenaten aus Aniszellkulturen mit monospezifischem Anti-ICL-Serum.
 Offene Symbole: 72-stündige Inkubation der Kultur in saccharosefreiem Nährmedium
 Dunkle Symbole: Kultivierung der Zellkultur in saccharosehaltigem Nährmedium
 Antiserumkonzentration: ▲, 625µg/ml; ●, 250µg/ml; □, 125µg/ml

6.2. Zeitlicher Verlauf der Induktion von ICL

6.2.1. Verlauf der Induktion bei Saccharoseentzug

Anis-Zellkulturen wurden nach 6-tägiger Anzucht auf saccharosefreies Nährmedium umgesetzt. Alle 24h wurde eine Probe entnommen. Die präparierten Rohpartikelfractionen wurden über SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Die Autoradiographie mit ^{125}I -Protein A (Abb.26, Bahn 4, 5,7) zeigt eine einzige Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 62kD. Bis zum 72-Stundenwert nimmt die Enzymproteinmenge kontinuierlich zu, wobei das Probenvolumen stets auf die gleiche Menge an Frischgewicht der Zellen bezogen wurde.

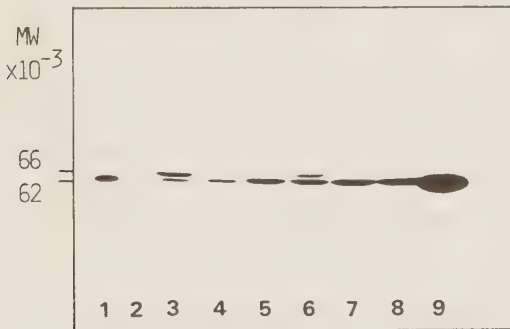


Abb.26: Zeitlicher Verlauf der Induktion von ICL in Aniszellkulturen.

- 1 GF aus Kulturen "72h ohne Sacch", davon 24h Acetat 10mmol/l
- 2 GF aus Kulturen "mit Sacch"
- 3 RPF, 24h ohne Sacch, 10mmol/l Acetat
- 4 RPF, 24h ohne Sacch
- 5 RPF, 48h ohne Sacch
- 6 RPF, 48h ohne Sacch, 10mmol/l Acetat
- 7 RPF, 72h ohne Sacch
- 8 RPF, 72h ohne Sacch, 10mmol/l Acetat
- 9 Gereinigte ICL aus Helianthus annuus

In Bahn 9 ist die gereinigte ICL aus Sonnenblumenkotyledonen mit der aus Zellkulturen auf gleicher Höhe, was auf gleiches Molekulargewicht hindeutet. Daß ICL durch Saccharose reprimiert wird, wird durch das Fehlen jeglicher Radioaktivität in Bahn 2 deutlich, in der die Glyoxysomalfraktion aufgetragen wurde, die durch Aktivitätsmessungen von CAT identifiziert worden war. Dagegen zeigt die Autoradiographie der Glyoxysomalfraktion aus dereprimierten Zellkulturen eine Schwärzung (Bahn 1).

6.2.2. Einfluß von Acetat

Ganz andere Ergebnisse erhält man, wenn dem Induktionsmedium zusätzlich Acetat appliziert wurde (Abb.26, Bahn 3,6,8). Außer dem 62kD-Peptid tritt ein weiteres ICL-Protein auf, das aber um ca. 4kD schwerer ist und offensichtlich mehr Enzymprotein darstellt (Bahn 3). Im Verlauf der Inkubation der Kulturen in Induktionsmedium verschwindet dieses 66kD-Peptid, während des 62kD-Peptid kontinuierlich zunimmt, so daß nach 72h kein qualitativer Unterschied mehr zum ICL-Protein besteht, das nur in saccharosefreiem Nährmedium induziert wurde. Die zeitliche Änderung des Auftretens des 66kD-Proteins läßt vermuten, daß es sich hierbei eventuell um ein Vorläuferprotein handeln könnte, das infolge limitierter Proteolyse zum reifen 62kD-Protein verkürzt wird. Werden Zellkulturproben bereits nach 12h Inkubationsdauer in acetathaltigem Induktionsmedium auf ICL analysiert, so ist hauptsächlich die 66kD-Bande in der RPF sichtbar (Abb.27a). Die Analyse zeigt, daß das 66kD-Protein sogar über 24h erhalten bleibt. Nach 48h ist dann das 62kD-Protein sichtbar und nach 60h dominant.

Auch in der Glyoxysomalfraktion acetatbehandelter Zellkulturen lassen sich zwei ICL-Proteine nachweisen, wobei das leichtere 62kD-Protein stärker ausgeprägt ist (Abb. 27b, Bahn 1,2).

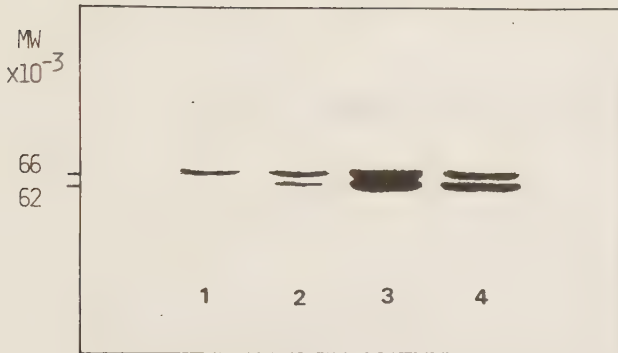


Abb.27a: Verlauf des Auftretens von ICL in der RPF von Aniszellkulturen, die auf saccharosefreies, acetathaltiges Medium umgesetzt wurden.

- 1 12h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 2 24h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 3 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 4 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat

Über das Auftreten zweier Isocitratlyasen unterschiedlichen Molekulargewichts wurde bereits von Riezman et al. (1980) berichtet. Khan et al. (1977), Frevert und Kindl (1978), Zimmermann und Neupert (1980) und Pinzauti et al. (1983) haben das Erscheinen von zwei Isocitratlyasen als möglichen proteolytischen Prozeß bei der Enzymreinigung gewertet. Über die Änderungen der Relation der ICL-Proteine als Funktion der Induktionszeit oder Keimungszeit wurde allerdings nichts ausgesagt.

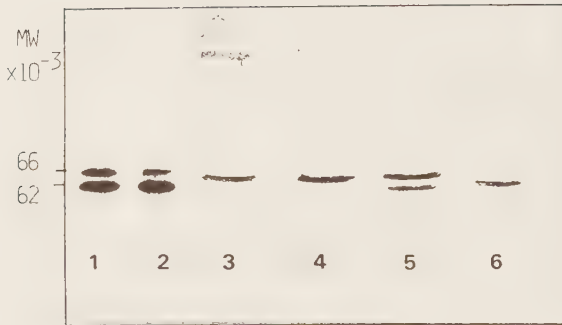


Abb.27b: Verlauf der Induktion von ICL in der Cytoplasmafraktion (SF) und Glyoxysomalfraktion von Aniszellkulturen, die in saccharosefreiem, acetathaltigen Medium inkubiert wurden.

- 1 Glyoxysomalfraktion, 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 2 Glyoxysomalfraktion, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 3 SF, 12h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 4 SF, 24h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 5 SF, 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 6 SF, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat

6.2.3. Hemmung der Induktion

Die Induktion von ICL kann durch Cycloheximid vollständig gehemmt werden (Abb.28). Wird Cycloheximid durch Actinomycin D ersetzt, so wird nach 14h trotzdem das 66kD-Protein exprimiert und nach 35h kann zusätzlich auch die 62kD-Bande beobachtet werden.

Cycloheximidgaben nach 14-stündiger Inkubationszeit für weitere 21h verhindern das Erscheinen des 62kD-Proteins. Dieser Befund deutet an, daß durch nachträgliche Cycloheximidgaben die limitierte Proteolyse, die normaler-

weise ab 12h einsetzt, komplett unterdrückt werden kann.

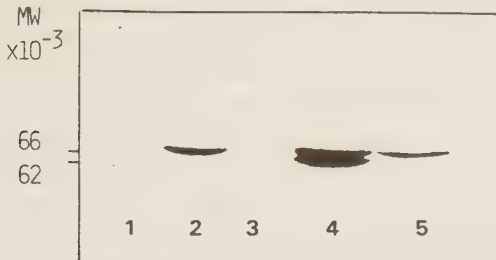


Abb.28: Verlauf des Auftretens von ICL in der RPF von Aniszellkulturen und Hemmung der Induktion durch Cycloheximid.

- 1 14h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +14h CHI (50 μ mol/l)
- 2 14h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +14h Act.D (14 μ mol/l)
- 3 35h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +35h CHI
- 4 35h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +35h Act.D
- 5 35h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +21h CHI

6.3. Repression

6.3.1. Rohpartikelfraktion

Aniszellkulturen wurden 72h in Induktionsmedium inkubiert und anschließend auf frisches Nährmedium mit 20g/l Saccharose umgesetzt. Wie aus den in Kapitel 4 gezeigten Daten hervorgeht, nimmt dabei die ICL-Aktivität drastisch ab und kann nach 60h nicht mehr nachgewiesen werden. Der Aktivitätsverlust könnte durch Inaktivierung (Theimer, 1976) oder proteolytische Spaltung (Khan et al., 1979) hervorgerufen werden.

Deshalb wurde ein Teil des Versuchsansatzes mit 25 μ mol/l Cycloheximid und ein Teil mit 16 μ mol/l Actinomycin D behandelt. Ein dritter Versuchsansatz ohne Hemmstoffzu-

gabe bildete die Kontrolle.

Alle 24h wurde eine Probe entnommen und ICL in der RPF immunologisch nachgewiesen.

Die Ergebnisse sind in Abb.29 dargestellt.

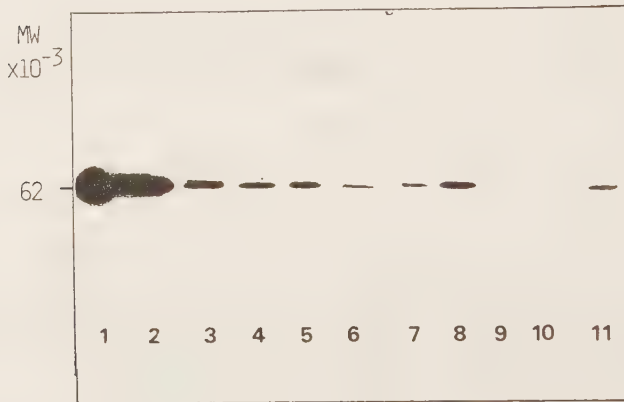


Abb.29: Verlauf der Repression induzierter ICL in der RPF von Aniszellkulturen und Hemmung durch Cycloheximid.

- 1 Gereinigte ICL aus Sonnenblumen
- 2 Gereinigte ICL aus Sonnenblumen
- 3 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch
- 4 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch, +24h Act.D (16µmol/l)
- 5 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch, +24h CHI (25µmol/l)
- 6 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch
- 7 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch, +48h Act.D
- 8 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch, +48h CHI
- 9 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +72h mit Sacch
- 10 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +72h mit Sacch, +72h Act.D
- 11 Zellkultur, 72h ohne Sacch, +72h mit Sacch, +72h CHI

Die Bahnen 5, 8 und 11 geben die mit Cycloheximid behandelten Zellkulturen wieder, die Bahnen 4, 7 und 10 die mit Actinomycin behandelten. Auffällig sind die Versuchsergebnisse mit Cycloheximid. Sogar 48h und 72h nach dem

Transfer in frisches, saccharosehaltiges Medium, ist Isocitratlyase noch vorhanden. Dagegen ist in den Kontrollversuchen ohne Transkriptions- und Translationshemmstoffe bereits nach 48h kaum noch ICL nachweisbar, und nach 72h völlig verschwunden. Actinomycin D, ein Hemmstoff für RNA-Synthese (Key, 1966), hat offensichtlich keinen Einfluß auf das Verschwinden von ICL. Auch in Flachskeimlingen, bei denen es Hinweise für das Auftreten einer ICL-spezifischen Endopeptidase gibt (Khan et al., 1979), die anscheinend den Abbau von ICL bewerkstelligt, vermag Actinomycin D nur teilweise und in hohen Konzentrationen den Abbau zu verhindern. Dagegen wurde durch Cycloheximid der ICL-Abbau vollständig gehemmt. Antigene Spaltprodukte von Isocitratlyase konnten nicht gefunden werden.

6.3.2. Rohhomogenat

Verfolgt man den Verlauf der Repression von ICL im Rohhomogenat (Abb.30), so werden auf dem Autoradiogramm antigene Peptide sichtbar, die ein Molekulargewicht von ca. 43kD besitzen. Dieses 43kD-Peptid könnte das Abbauprodukt aus einer proteolytischen Spaltung der ICL sein. In der cycloheximidbehandelten Zellkultur werden die Abbauprodukte erst 48h nach Transfer der Zellaggregate auf frisches, saccharosehaltiges Nährmedium erkennbar (Abb.30, Bahn 7), während bei den übrigen Versuchsansätzen, in denen Actinomycin D oder PMSF appliziert worden war, bereits nach 24h Spaltprodukte zu sehen sind (Abb.30, Bahn 4,6).

Dementsprechend ist auch der Verlauf der Enzymaktivitäten. In solchen Kulturen, denen Cycloheximid verabreicht wurde, bleiben 60% der ICL-Aktivität auch nach 48h erhalten. Im Kontrollversuch jedoch ist die Enzymaktivität bis zu diesem Zeitpunkt auf Null abgesunken. Actinomycin D und PMSF scheinen keinen Einfluß auf die Aktivität zu haben, da auch hier die ICL-Aktivität fast vollständig

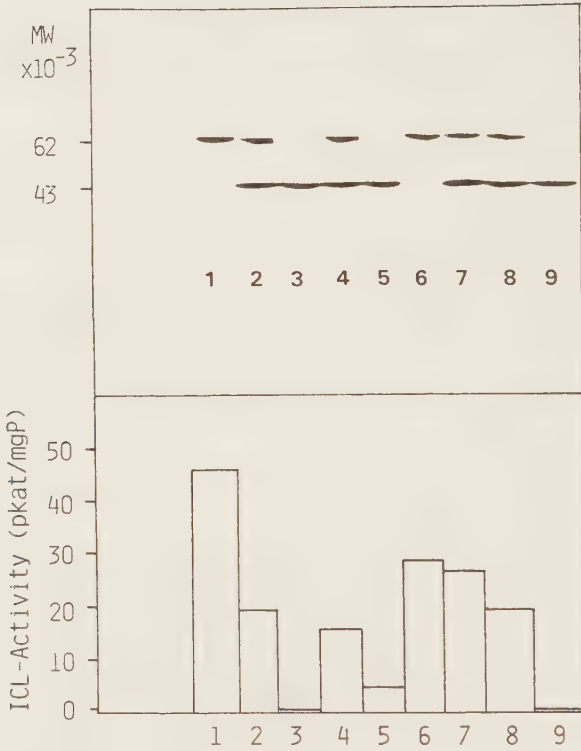


Abb.30: Verlauf der Repression induzierter ICL in Anis-Zellkulturen-Rohhomogenat und Hemmung der Repression durch Cycloheximid.

- 1 72h ohne Sacch
- 2 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch
- 3 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch
- 4 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch, +24h Act.D (16µmol/l)
- 5 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch, +48h Act.D
- 6 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch, +24h CHI (13µmol/l)
- 7 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch, +48h CHI
- 8 72h ohne Sacch, +24h mit Sacch, +24h PMSF (0,2mmol/l)
- 9 72h ohne Sacch, +48h mit Sacch, +48h PMSF

inhibiert ist. Offenbar wird durch Cycloheximid die Synthese einer ICL-spezifischen Peptidase gehemmt.

Die Repression und der Abbau von ICL wird nicht nur in Saccharosemangelmedium, sondern auch in acetatinduzierten Zellen durch Zugabe von Saccharose eingeleitet, wobei sowohl das 66kD- als auch das 62kD-Protein inaktiviert und abgebaut wird (Abb.31). Das auftretende Spaltprodukt besitzt auch hier eine Molekulargröße von 43kD. Der Abbau wird auch hier offensichtlich durch Cycloheximidgaben blockiert (Abb.31, C, D), da keine ICL-Bruchstücke gefunden werden.

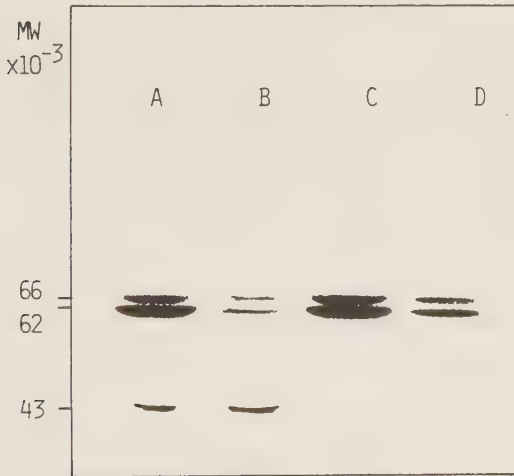


Abb.31: Verlauf der Repression acetatinduzierter ICL im Rohhomogenat von Aniszellkulturen und Hemmung der Repression durch Cycloheximid.

- A 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, 18h mit Sacch
- B 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, 38h mit Sacch
- C 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, 18h mit Sacch,
+38h CHI (50 μ mol/l)
- D 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, 38h mit Sacch,
+38h CHI

7. Immundetektion von Katalase

Katalaseaktivität ist im Gegensatz zu ICL auch in glucose-reprimierten Zellkulturen stets vorhanden. Durch Umsetzen der Kultur auf saccharosefreies Medium nimmt nicht nur die Aktivität, sondern korrespondierend dazu auch das CAT-Protein deutlich zu. Während in der cytosolischen Fraktion keine oder nur geringe CAT-Proteinmengen nachweisbar sind, ist in der RPF bzw. in den Glyoxysomen eine drastische Zunahme zu erkennen (Abb.32).

Erneute Saccharosegaben zu vollständig dereprimierten Zellen führen zu einem teilweisen Verlust von CAT-Protein, jedoch nicht zu einem vollständigen Abbau, wie es bei der ICL der Fall ist. Auch wurden keine antigenen Degradationsprodukte nachgewiesen (Abb.33).

Ein Vergleich mit gereinigter CAT aus Sonnenblumenkotyledonen zeigt, daß die Untereinheiten von Aniszellkultur-CAT die gleiche Molekülgröße besitzen wie die aus Sonnenblumen.

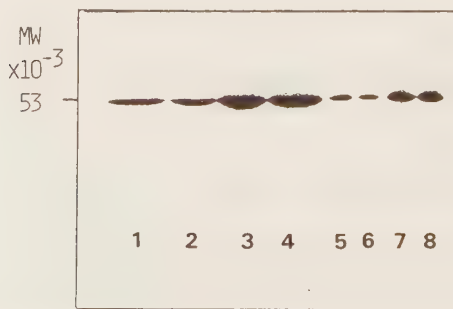


Abb.32: Verlauf der Entwicklung von Katalase in Aniszellkulturen, die auf saccharosefreies, acetathaltiges Medium umgesetzt wurden. Der Auftrag in den Reihen 1 - 4 entspricht 36mg FG, in den Reihen 5 - 8 25mg FG.

- 1 RPF, 12h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 2 RPF, 24h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 3 RPF, 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 4 RPF, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 5 GF, 12h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 6 GF, 24h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 7 GF, 48h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat
- 8 GF, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat

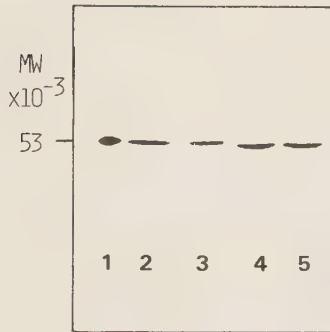


Abb.33: Verlauf der Katalaseentwicklung in Aniszellkulturen in saccharosehaltigem Medium, die zuvor für 60h in saccharosefreiem, acetathaltigen Medium inkubiert worden waren.

- 1 Gereinigte Katalase aus Sonnenblumenkotyledonen
- 2 RH, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +48h mit Sacch
- 3 RH, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +72h mit Sacch
- 4 RPF, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +40h mit Sacch
- 5 RPF, 60h ohne Sacch, +10mmol/l Acetat, +60h mit Sacch

D. D i s k u s s i o n

Bei der Regulation des Glyoxylatzyklus nehmen Glucose bzw. glycolytische Metabolite eine Schlüsselstellung ein. Durch sie werden die induzierbaren Enzyme Isocitratlyase und Malatsynthase bei Bakterien (Griffith, 1979), Pilzen (Witt et al., 1966; Duntze et al., 1969; Flavell und Woodward, 1971; Nabeshima et al., 1977; Theimer et al., 1978) und Algen (John et al., 1970; McCullough und John, 1972b; Thurston et al., 1973) reprimiert. Auch bei der Keimung von fettspeichernden Samen höherer Pflanzen, wo der Glyoxylatzyklus in den Glyoxysomen eine zentrale Rolle bei der Umwandlung der Speicherfette in Kohlenhydrate spielt, können Glucosegaben die Enzyminduktion teilweise verhindern (Lado et al., 1968; Hock, 1969; Longo und Longo, 1970).

Bei diesem Verbindungsglied zwischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel scheint es sich somit um ein allgemeines, bei prokaryotischen wie eukaryotischen Zellen vorkommendes Regulationsprinzip zu handeln.

Im Gegensatz zu den fettspeichernden Geweben höherer Pflanzen, die aus vielen unterschiedlich differenzierten Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen bestehen, können in Suspensionskulturen alle Zellen durch definier-

te, kontrollierbare Wachstumsbedingungen weitgehend im gleichen Differenzierungsstadium (Proembryonen) gehalten werden. Als ein solches, durch einfache exogene Faktoren steuerbares Modellsystem boten sich Zellsuspensionskulturen von Anis (*Pimpinella anisum* L.) an; bei ihnen bewirkt der Entzug der Kohlenhydratquelle im Medium (bzw. Versorgung mit Acetat als einzigem C-Lieferanten) nicht nur die Induktion von Schlüsselenzymen der β -Oxidation der Fettsäuren und des Glyoxylsäurezyklus (Lutzenberger und Theimer, 1983), sondern auch die Bildung komplett ausgerüsteter Kompartimente für diese Enzyme, der Glyoxysomen (Kudielka et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Regulation und Kompartimentierung eines der durch Substrate induzierbaren Schlüsselenzyme, nämlich der Isocitratlyase, untersucht. Als Vergleichsenzym wurde Katalase, ein konstitutives Markerenzym der Peroxisomen, gewählt.

Durch Saccharoseentzug wird allerdings keineswegs in Zellkulturen aller Pflanzenspezies die Induktion von ICL-Aktivität angeregt, obwohl alle untersuchten Zellkulturen über Peroxisomen verfügen, was sich in der partikelgebundenen Katalaseaktivität im Saccharosegradienten zeigt (Abb.2). So konnte in Zellkulturen von Petersilie, Raps oder Gurken, deren Samen Fette speichern und abbauen können, keine Induktion der ICL beobachtet werden; ob in diesen Fällen die ICL-Inaktivität durch Intermediärprodukte des TCA-Zyklus verursacht wird, wobei z.B. Succinat und Oxalacetat (Gemmrich, 1979; Rao und Mc Fadden, 1965) oder PEP (Vanni et al., 1979) vorgeschlagen wurden, oder ob die ICL durch einen proteinösen Inhibitor maskiert ist, wie es offenbar bei reifenden Gurkensamen (Frevert et al., 1980) vorkommt, muß durch weiterführende Versuche geklärt werden.

Andererseits konnte bei *Linum*, *Ricinus* und *Cannabis* ICL-

Aktivität induziert werden, die allerdings nur im Cytosol und nicht partikelgebunden lokalisiert war (Tab.2; Abb.3 u.4). Dies kann als Hinweis gelten, daß ICL zwar im Cytosol an freien Polysomen synthetisiert werden kann (Frevert et al., 1980; Kindl et al., 1980; Roberts und Lord, 1981; Zimmermann und Neupert, 1980), für einen gerichteten Import des Enzyms in die bereits existierenden Peroxisomen aber wahrscheinlich noch andere Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. ein besonderes Processingprotein oder spezielle Aufnahmerezeptoren in der Peroxisomenmembran; sie müssen möglicherweise zusätzlich zum eigentlichen Enzymprotein mit induziert werden, damit eine geordnete Bildung von Glyoxysomen möglich wird, wie sie in den fettspeichernden Kotyledonen dieser Pflanzenarten bei der Keimung abläuft (Gerhardt, 1978; Beevers, 1979). Insofern bieten sich diese Zellkulturen als neuartiges Modellsystem für weiterführende Untersuchungen zum Induktionsablauf an, da bei ihnen Enzymbildung und Kompartimentierung im Vergleich zur intakten Pflanze entkoppelt zu sein scheinen.

Dagegen können offenbar bei Zellkulturen der Umbelliferen Genexpression und Kompartimentierung des glyoxysomalen Leitenzyms ICL durch Veränderungen des Substratangebotes unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in geordneter Weise induziert werden (Tab.2; Abb.5,7 u.9).

Microbodies aus glucosereprimierten Zellkulturen von Koriander, Pimpinella affinis und Pimpinella anisum, die weder ICL- noch MS-Aktivität besitzen, sedimentieren im Gradienten zusammen mit Mitochondrien bei einer Dichte von 1,18kg/l und nicht in einer für Microbodies typischen Dichte von 1,22 - 1,26kg/l. Das Vorkommen einzelner Enzymaktivitäten der β -Oxidation von Fettsäuren (Lutzenberger und Theimer, 1983) läßt aber vermuten, daß es sich hier um eine Art Präglyoxysomen handelt, wie sie in frühen Stadien der Samenreifung bei Baumwolle (Choinsky und

Trelease, 1978; Miernyk und Trelease, 1981; Bortman et al., 1981) und Gurke (Frevert et al., 1980; Köller et al., 1979) gefunden wurden, wo sie zwar ebenfalls Enzymaktivitäten der β -Oxidation der Fettsäuren, aber keine ICL-Aktivität besitzen. Im weiteren Verlauf der Reifung nehmen diese Präglyoxysomen aus Baumwolle an Dichte zu, was auf eine Steigerung der Proteinsynthese mit anschließendem Transport in die Kompartimente zurückgeführt wurde (Choinsky und Trelease, 1978).

Eine solche Dichtezunahme der Präglyoxysomen tritt auch bei P. anisum ein, nachdem dem Nährmedium die Kohlenhydratquelle entzogen wurde. Parallel zum Auftreten von Aktivitäten von ICL, MS und AOX werden auch die Enzymaktivitäten der β -Oxidation der Fettsäuren ca. 3-fach gesteigert und aus der gleichzeitig beobachteten Dichtezunahme der sie tragenden Zellstrukturen wurde vermutet, daß bei der Bildung der nun enzymatisch vollständigen Glyoxysomen die massive Neusynthese und Aufnahme von Protein beteiligt ist (Kudielka und Theimer, 1981; Lutzenberger und Theimer, 1983).

Ähnlich wie bei der Keimung von Ölsamen (Beevers, 1979; Trelease, 1984) steigen die glyoxysomalen Enzymaktivitäten ICL und CAT (Abb. 10a,b) in Aniszellkulturen während der Induktionsphase rasch an; ob diese Zunahme an Aktivität und Protein in der Glyoxysomenbande im Dichtegradienten auch hier mit einer Steigerung der Glyoxysomenzahl korrespondiert wie bei fettspeichernden Geweben (Kagawa und Beevers, 1975; Vigil, 1970; Wanner et al., 1982), muß erst noch durch feinstrukturelle morphometrische Analysen geklärt werden. Aber die anfangs rasch ansteigende und dann gleichbleibende Aktivität in der Cytoplasmafraktion, begleitet von einer stetig steigenden Anreicherung der Enzymaktivitäten in der RPF deuten darauf hin, daß bei den Zellkulturen die Matrixenzyme ICL und

CAT ebenfalls im Cytosol synthetisiert und erst nachträglich in die entsprechenden Organellen transportiert werden.

Allerdings sind insgesamt die Enzymaktivitäten und damit sehr wahrscheinlich die Enzymmengen wie meistens bei Zellkulturen (Moore und Beevers, 1974; Gregor, 1977; Hunt et al., 1978) nur so niedrig, daß zur Gewinnung von Antisera eine Enzymisolierung aus Zellkulturen technisch unverhältnismäßig aufwendig durchzuführen ist. Da erfahrungsgemäß Antikörper gegen Proteine höherer Pflanzen (Kindl et al., 1980) auch im heterologen System mit Antigenen recht gut kreuzreagieren, erfolgte die Isolierung von ICL und CAT zur Gewinnung von Antisera aus Sonnenblumenkotyledonen, wo diese Enzyme am 3.-4.Tag nach Keimungsbeginn reichlich vorkommen.

ICL aus drei Tage alten Sonnenblumenkotyledonen besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 325kD, das offensichtlich aus fünf gleichen Untereinheiten zusammengesetzt ist (Abb.19b,20). Ein pentameres ICL-Protein mit gleichem Molekulargewicht wurde bisher nur von Lamb et al. (1978) in Cucumis sativus-Kotyledonen nachgewiesen, während Frevert und Kindl (1978) bei derselben Pflanzenspezies nur ein tetrameres ICL-Protein mit dem Molekulargewicht 255kD finden konnten. Im Gegensatz zu diesen und den vorliegenden Untersuchungen isolierten kürzlich Zemlyanukhin et al. (1984) aus Sonnenblumenkotyledonen ein ICL-Protein mit dem ungewöhnlich niedrigen Molekulargewicht von 133kD. Ob diese Diskrepanz auf eine Sortenspezifität oder auf die unterschiedlichen Reinigungsverfahren zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Auch wenn die Molekulargewichte der nativen Enzyme differieren, so zeigen die Untereinheiten innerhalb der pflanzlichen Spezies und bei *Neurospora* die gleiche Größe: ICL aus Sonnenblumenkotyledonen, Ricinus communis und Aniszellkulturen, 62kD;

aus Cucumis sativus 64kD und aus Linum und Neurospora 67kD. Außerdem besitzt ICL aus den Sonnenblumenkotyledonen eine abweichende apparente Ladung, da sie im Gegensatz zur ICL aus Cucumis sat. und Linum usit. nicht an DEAE-Cellulose gebunden wird.

Als zweites glyoxysomales Leitenzym wurde CAT aus Sonnenblumenkotyledonen bis zur Homogenität gereinigt. Sie ist ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 220kD und zerfällt nach Behandlung mit SDS in vier gleiche Untereinheiten mit je 53kD (Abb.19a u.20). Diese Daten decken sich mit Befunden, wie sie an anderen Objekten erhoben wurden und die zeigen, daß alle bislang untersuchten Katalasen innerhalb des Pflanzenreiches praktisch die gleiche Molekülgröße besitzen (z.B. Lens culinaris: 225kD, Schiefer et al., 1976; Cucumis sat.: 225kD, Lamb et al., 1978; Ipomoea batatas: 240kD, Esaka und Asahi, 1982; Cucurbita sp.: 230 - 250kD, Yamaguchi und Nishimura, 1984) und aus vier Proteinuntereinheiten aufgebaut sind. In den Kotyledonen der Sonnenblumen konnten auch keine Isoenzyme der Katalase gefunden werden, wie es für Gurkenkotyledonen (Lamb et al., 1978) und Linsenblättern (Schiefer et al., 1976) gezeigt wurde. Dagegen scheint in Senfkeimlingen (Drumm und Schopfer, 1974), Mais-Endosperm (Scandalios, 1968) und Rattenleber (Jones und Masters, 1978) Katalase in mehreren Isoenzymen vorzukommen.

Obwohl Helianthus annuus (Asteraceae) und Pimpinella anisum (Umbelliferae) zwei Familien angehören, die pflanzensystematisch sehr weit auseinanderliegen, so sind doch deren glyoxysomalen Enzyme CAT und ICL immunologisch ähnlich, was durch die Kreuzreaktionen gezeigt werden kann. Klassische Verfahren wie der Ouchterlony-Test (Abb.23a,b), Enzymtitration mit Antiserum (Abb.24) oder Immunoblotting (Abb.26 u.33) demonstrieren, daß die gegen Proteine

aus Sonnenblumen gerichteten Antikörper auch im heterologen System mit Zellsuspensionskulturen von Anis zur Untersuchung der Regulation von ICL und CAT eingesetzt werden können.

In Extrakten von mit Saccharose versorgten reprimierten Zellkulturen ist kein antigenes ICL-Protein zu entdecken (Abb.25 u.26); es tritt erst dann nach Saccharoseentzug auf, wenn in den Homogenaten auch Enzymaktivität zu messen ist. Offensichtlich wird ICL erst als Reaktion auf den Kohlenhydratmangel im Nährmedium de novo synthetisiert und ist nicht auf eine Entkopplung des ICL-Proteins von einem spezifischen Inhibitor zurückzuführen (Frevort et al., 1980). Wie Abb.28 zeigt, wird die Neusynthese des ICL-Proteins durch 50µmol/l Cycloheximid, einem Translationshemmstoff, blockiert. Ähnliche Befunde wurden auch durch Proteinsynthesegifte bei keimenden Samen von Citrullus vulgaris (Hock und Beevers, 1966), Glycine max (Tester, 1976) und Gossypium hirsutum (Smith et al., 1974) bzw. mit serologischen Methoden bei Cucumis sat. (Becker et al., 1978) erhoben.

Der Transkriptionshemmer Actinomycin D (14µmol/l) zeigt aber keine Wirkung. Da Actinomycin D jedoch in höheren Dosen die Anis-Zellen seneszieren läßt, scheint die mangelnde Wirksamkeit des Transkriptionshemmers nicht auf mangelnder Aufnahme in die Zellen zu beruhen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß in reprimierten Kulturen die mRNA für ICL möglicherweise in nicht translatierbarer Form bereits vorliegt und die Regulation auf der Ebene der Translation stattfinden könnte. Auch in reifen Samen konnte mRNA für ICL indirekt (Hock und Beevers, 1966; Smith et al., 1974; Ihle und Dure, 1972; Khan et al., 1979) bzw. direkt (Weir et al., 1980) nachgewiesen werden, die allerdings durch einen noch ungeklärten Mechanismus nicht translatiert werden kann.

Zusätzliche Gaben von Acetat an Anis-Zellkulturen führen nach Saccharoseentzug zu einer weiteren Steigerung der ICL-Aktivität, während Acetat in Gegenwart von Saccharose keine Wirkung zeigt (Kudielka, 1980). Wie aus Abb.27b deutlich hervorgeht, konnte mit Hilfe immunologischer Methoden nun nachgewiesen werden, daß nach Saccharoseentzug und Acetatgabe sowohl im Cytoplasma als auch in den Glyoxysomen ein zusätzliches antigenes ICL-Protein auftritt, das ein um 4kD höheres Molekulargewicht, nämlich 66kD, besitzt, und sich dadurch von dem 62kD-ICL-Protein, das nur nach Saccharoseentzug induziert wird, unterscheidet. Der zeitliche Verlauf des Auftretens (Abb.27a,b) zeigt auch, daß das höhermolekulare, durch Acetat induzierte, Enzymprotein schon nach 12h nachweisbar ist. Dagegen erscheint das niedermolekulare, acetatunabhängig induzierte Enzymprotein erst 24h nach Eintritt der induktiven Bedingungen, unabhängig davon, ob den Zellen nun Saccharose entzogen worden war oder sie zusätzlich mit Acetat versetzt wurden. Dies könnte als Hinweis für die Existenz von zwei unterschiedlichen ICL-Genen gelten, wobei die Translation des einen Transkriptionsprodukts acetatabhängig reguliert wird.

Das Auftreten zweier ICL-Proteine könnte aber auch die Folge einer unterschiedlich regulierten Prozessierung der pre-mRNA eines gemeinsamen Gens darstellen. Beide Transkriptionsprodukte liegen nämlich offensichtlich als maskierte mRNA vor, da Actinomycin D in beiden Fällen wirkungslos ist (Abb.28). Allerdings kann das 4kD-Differenzpeptid keine Transiteigenschaften besitzen, da beide ICL-Proteine auch in den isolierten Glyoxysomen in solchen Mengen nachgewiesen wurden, daß eine "Verunreinigung" durch 66kD-Protein, das noch unprozessiert an der Membran haftet, unwahrscheinlich ist.

Andererseits zeigt der Entwicklungsverlauf der beiden ICL-Proteine im Autoradiogramm eine Verschiebung des apparenten Mengenverhältnisses von 66kD-/64kD-Protein zugun-

sten des 62kD-Proteins; dies könnte auch als limitierte Proteolyse einer höhermolekularen Vorläufer-ICL gedeutet werden. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das Auftreten des 62kD-Proteins durch Cycloheximidbehandlung 14h nach Saccharoseentzug gestoppt werden kann, wenn das 66kD-Protein bereits nachweisbar war (Abb.28, Bahn 5); die Translation einer Processing-Protease müßte dann durch Cycloheximid gehemmt worden sein.

Der Austausch von Saccharose durch Acetat im Medium führt auch bei CAT zu einer Steigerung der Enzymaktivitäten und zu einem sichtbaren Zuwachs des Enzymproteins (Abb. 32). Da während der Entwicklung im induktiven Medium mit oder ohne Acetat stets nur eine einheitliche Proteingröße auftritt (Abb.32), scheint es bei CAT keine ineinander überführbaren Molekülformen zu geben. Inwieweit bei der Synthese "processing" aus translatierten Vorstufen stattfindet, kann anhand der dargelegten Experimente allerdings nicht beantwortet werden. Ähnliche Resultate liegen aus Versuchen an Rattenleber (Goldmann und Blobel, 1978; Robbi und Lazarow, 1978), *Saccharomyces cerevisiae* (Ammerer et al., 1981) und *Candida tropicalis* (Jamada et al., 1982) vor.

Andererseits führen Saccharosegaben bei dereprimierten Kulturen zu einem Blockieren der ICL-Synthese und zum völligen Verschwinden der ICL-Aktivität und des 62kD- bzw. 66kD-Enzymproteins (Abb.29 u.30). Gleichzeitig tritt im Cytoplasma ein Peptid mit dem Molekulargewicht von 43kD auf, das zwar antigene Eigenschaften besitzt, aber enzymatisch inaktiv ist.

Das Fehlen dieses Peptids in der Rohpartikel- und der Glyoxysomalfraktion kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß wahrscheinlich ICL zuerst aus dem Organell ausgeschleust und dann proteolytisch im Cytosol abgebaut wird. Dies wirft viele Fragen nach Mechanismus und Regu-

lation des gezielten Exports eines solchen Enzyms aus den Glyoxysomen auf. Möglicherweise könnten Durchtritt durch die Membran und Proteolyse der abzubauenen ICL gekoppelt sein, was aber eine Inkorporation der spezifischen Protease in die Glyoxysomenmembran erfordern würde. Die Bildung des antigenen 43kD-Peptids wird in den Zellkulturen in Gegenwart von Cycloheximid ebenso verhindert wie das Verschwinden der ICL-Aktivität. Offensichtlich bewirken Saccharosegaben die Translation dieser ICL-spezifischen Protease. Das 43kD-Peptid ist die einzige, serologisch nachweisbare Zwischenstufe des proteolytischen Abbaus, der nicht nur das 62kD-Protein, sondern auch das 66kD-Protein erfassen kann (Abb.31).

Doch beim teilweisen Verschwinden der CAT-Aktivität können nach Saccharosegabe keine immunologisch nachweisbaren Katalaseabbauprodukte festgestellt werden; gleichwohl nimmt auch dabei die apparente Menge an Enzymprotein in der RPF deutlich ab (Abb.33), während die Enzymaktivitäten wiederum auf die Ausgangswerte zurückgehen (Abb.10b), aber nach wie vor in den Microbodies lokalisiert bleiben (Abb.33). Da es eher unwahrscheinlich erscheint, daß eine CAT-abbauende Protease in den Glyoxysomen nur einen Teil des Enzyms inaktiviert, muß aus diesen Daten angenommen werden, daß CAT aus den Organellen ausgeschleust und im Cytoplasma abgebaut wird.

Als Gesamtkonzeption kann folgendes Modell (Abb.34) zur substratabhängigen Regulation von Isocitratlyase in den Aniszellkulturen vorgeschlagen werden:

Bei Saccharosemangel bzw. Acetatgaben als einzige Kohlenstoffquelle wird Isocitratlyase durch Genaktivierung oder Translation maskierter pre-mRNA de novo in der jeweiligen substratbedingten Form als 62kD- bzw. 66kD-Protein synthetisiert und in bereits vorgeformte Peroxisomen inkorporiert. Dort wird das 66kD-Enzym durch eine neu synthe-

tisierte Processingprotease zum 62kD-Enzym gekürzt. Erneute Saccharosezufuhr bewirkt ein Ausschleusen der Isocitratlyase aus den Glyoxysomen und die Synthese einer ICL-spezifischen Protease, die das Enzym über 43kD-Zwischenstufen abbaut.

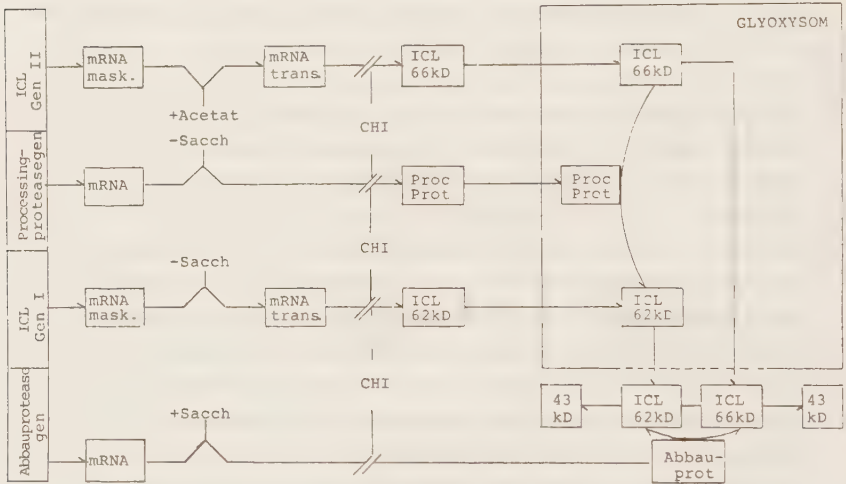


Abb.34: Modell zur substratabhängigen Regulation von Isocitratlyase in Aniszellkulturen.

Insgesamt bringen die Daten erste klare Hinweise dafür, daß in den Glyoxysomen lokalisierte Enzyme durch individuelle Import- und Prozessierungsmechanismen von der Zelle reguliert werden können. Dazu besitzt die Zelle offenbar die Kompetenz, spezifische Proteine für den Abbau je nach Stoffwechsellage neu zu synthetisieren.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die substratabhängige Regulation und der Verlauf der Glyoxysomenbildung bei Zellsuspensionskulturen untersucht.

1. Aus Hypokotylen und Endospermgewebe wurden Zellsuspensionskulturen von verschiedenen, ölspeichernden Pflanzen gewonnen. Nach Anzucht auf saccharosehaltigem Medium ergab die Zellfraktionierung der Zellkulturen von Brassica napus, Cannabis sativa, Coriandrum sativum, Cucumis sativus, Linum usitatissimum, Petroselinum hortense, Pimpinella affinis, Pimpinella anisum Ricinus communis partikulär gebundene Katalaseaktivität (Peroxisomen), doch keine ICL-Aktivität. Genauere Untersuchungen der Peroxisomen aus Anis-Zellkulturen ergaben, daß sie zusätzlich Enzymaktivitäten der β -Oxidation der Fettsäuren (außer Acyl-CoA-Oxidase) enthielten und bei einer Schwebedichte von 1,20kg/l sedimentierten.
2. Saccharoseentzug und gleichzeitige Acetatgaben führten außer bei Petersilie-, Raps- und Gurkenzellkulturen bei allen anderen zur Induktion von ICL-Aktivität, die bei Zellkulturen von Linum, Ricinus und Cannabis in der Cytosolfraktion, bei Koriander, Pimpinella affinis

und Pimpinella anisum aber teilweise partikelgebunden vorlag. Die höchste ICL-Induktion wurde in Aniszellkulturen erzielt, bei denen in diesem Nährmedium enzymatisch vollständige Glyoxysomen gebildet wurden, die im Saccharosegradienten mit gesteigerter Schwebedichte von 1,23kg/l sedimentierten.

3. Zum immunologischen Nachweis der regulierbaren Enzyme Isocitratlyase und Katalase wurden die Antiseren aus Kaninchen gewonnen. Dazu wurden die Enzyme wegen der geringen Enzymmengen in Zellkulturen aus Sonnenblumenkotyledonen gereinigt. ICL wurde durch Aceton- und Ammoniumsulfatfällung, Hitzedenaturierung und Chromatographie in Sephadex G-200 und DEAE-Sephacel mit 51-facher Anreicherung gegenüber dem Acetonpräzipitat mit elektrophoretischer Homogenität gewonnen. ICL aus Sonnenblumen bindet nicht an DEAE-Sephacel. Das Molekulargewicht des nativen Enzyms beträgt 325kD. Es besteht aus 5 identischen Untereinheiten von 62kD. Optimale Enzymaktivität wird nur mit Mg^{2+} (2mmol/l) und DTE (2mmol/l) bei pH 7,7 erreicht. Der K_M -Wert betrug 1,2mmol/l (threo-D-Isocitrat).
4. Katalase aus Sonnenblumenkotyledonen ist im Gegensatz zu ICL hitzelabil und kann im Verlauf der Reinigung von ICL erst nach Chromatographie über Biogel-HTP mit 83-facher Anreicherung vollständig abgetrennt werden. Katalase ist aus 4 identischen Untereinheiten von je 53kD zusammengesetzt und hat ein Molekulargewicht von 220kD.
5. Antikörper gegen ICL und CAT aus Sonnenblumen waren monospezifisch und ergaben gute Kreuzreaktion mit ICL und CAT aus Extrakten von Aniszellkulturen, was durch Enzymaktivitätstitration, Ouchterlony-Test und Immunoblotting gezeigt wurde.

6. Die Immunoblotting-Analysen ergaben, daß die Induktion von ICL-Aktivität und die Steigerung der Enzymaktivitäten von Katalase in Aniszellkulturen nach Saccharoseentzug auf eine Enzymneusynthese zurückzuführen ist, die durch Cycloheximid, nicht aber durch Actinomycin D blockiert wird. Die induzierten ICL-Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von 62kD. Zusätzliche Acetatabgaben bewirken das Auftreten einer zweiten aktiven Isocitratlyase mit Untereinheiten von 66kD Molekulargewicht; Sie tritt hauptsächlich zu Beginn der Induktionsphase auf und wird innerhalb von 72h anscheinend durch limitierte Proteolyse in das 62kD-Protein verkürzt. Da beide ICL-Proteine gleichzeitig auch in Glyoxysomen nachweisbar sind, ist das Differenzpeptid keine notwendige Transitsequenz für die Aufnahme aus dem Cytosol in die Glyoxysomen.
7. Transfer induzierter Kulturen in frisches, saccharosehaltiges Medium führt zum vollständigen Verlust der ICL-Aktivität und einer Verringerung der Katalaseaktivität in der Glyoxysomal- und Cytosolfraktion. Damit einher geht der proteolytische Abbau des ICL-Proteins, der durch Cycloheximid gehemmt werden kann. Dabei entstehen antigene, nichtaktive Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 43kD, die nur in der Cytoplasma- und nicht in der Partikelfraktion nachweisbar sind, womit erstmals Hinweise erbracht wurden, daß das Enzym zum Abbau aus den Organellen ausgeschleust wird.
8. Aufgrund der Resultate wird folgende substratbedingte Regulation des glyoxysomalen Leitenzyms ICL in den Aniszellkulturen vorgeschlagen: Bei Saccharosemangel bzw. Acetat als einziger Kohlenstoffquelle wird das Enzym durch Genaktivierung oder Translation maskierter präformierter mRNA de novo in der jeweiligen substratabhängigen Form (mit 62kD bzw. 66kD Molekulargewicht)

synthetisiert und in vorgeformte Peroxisomen inkorporiert. Dort findet ein Processing des Enzyms mit 66kD zur 62kD-Form statt. Erneute Saccharosegabe bewirkt

- (1) ein Ausschleusen des Enzyms aus den Glyoxysomen und
- (2) Bildung einer ICL-spezifischen Protease, die das Enzym im Cytosol über 43kD Zwischenstufen inaktiviert und abbaut.

F. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Aasberg, K.E., T.Lien und G.Knutsen (1974). Induction of isocitrate lyase in synchronous cultures of *Chlorella fusca*. *Physiol. Plant* 31, 245-251.
- Ammerer, G., K.Richter, E.Hartter, H.Ruis (1981). Synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* catalase A in vitro. *Eur. J.Biochem.* 113, 327-331.
- Baechtel, F.S., H.A.Hopkins und R.R.Schmidt (1970). Continuous inducibility of isocitrate lyase during the cell cycle of the eucaryote *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 217, 216-221.
- Bajracharya, D. und P.Schopfer (1979). Effect of light on the development of glyoxysomal function in the cotyledons of mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 145, 181-186.
- Becker, W.M., C.J.Learer, E.M.Weir und H.Riezman (1978). Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. Developmental changes in cotyledonary protein, RNA and enzyme activities during germination. *Plant Physiol.* 62, 542-549.

- Beevers, H. (1979). Microbodies in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 159-193.
- Bieglmayer, C., G.Nahler und H.Ruis (1974). Membranen von Glyoxysomen aus Rizinus-Endosperm. Weitere Untersuchungen über die membrangebundenen Enzyme des Fettsäureabbaus und des Glyoxylatzyklus. Hoppe-Seyler's z.Physiol. Chem. 355, 1121-1128.
- Bieglmayer, C., J.Graf und H.Ruis (1973). Membranes of glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzymes bound to purified membrane preparations. Eur. J.Biochem. 37, 379-389.
- Bortman, S.J., R.N.Trelease und J.A.Miernyk (1981). Enzyme development and glyoxysome characterization in cotyledons of cotton seeds. Plant Physiol. 68, 82-87.
- Bradford, M.M. (1976). Protein assay by dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254.
- Breidenbach, R.W. und H.Beevers (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel sub-cellular particle from castor bean endosperm. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 462-469.
- Brody, M. und J.E.White (1972). Environmental factors controlling enzymatic activity in microbodies and mitochondria of *Euglena gracilis*. FEBS Lett. 23, 149-152.
- Brown, R.H., N.Collins und M.J.Merrett (1975). Peroxidative activity in *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 55, 1123-1124.
- Campbell, J.J.R., R.A.Smith und B.A.Eagles (1953). A deviation from the conventional tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta 11, 594.

- Choinski, J.S. und R.N.Trelease (1978). Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. II. Glyoxysomal enzyme development in embryos.
Plant Physiol. 62, 141-145.
- Cioni, M., G.Pinzauti und P.Vanni (1981). Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle.
Comp. Biochem. Physiol. 70B, 1-26.
- Collins, N. und M.J.Merrett (1975a). The localization of glycolate-pathway enzymes in Euglena.
Biochem. J. 148, 321-328.
- Collins, N. und M.J.Merrett (1975b). Microbody-marker enzymes during transition from phototrophic to organotrophic growth in Euglena.
Plant Physiol. 55, 1018-1022.
- Colonna, W.J. und B.A.Mc Fadden (1975). Isocitrate lyase from parasitic and free-living nematodes.
Arch. Biochem. Biophys. 170, 608-619.
- Cooper, T.G. und H.Beevers (1969). β -Oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm.
J.Biol. Chem. 244, 3514-3520.
- Cooper, T.G. (1971). The activation of fatty acids in castor bean endosperm. J.Biol.Chem. 246, 3451-3455.
- Davies, H.V. und J.M.Chapman (1979a). The control of food mobilization in seeds of Cucumis sativus L. I. The influence of embryonic axis and testa on protein and lipid degradation.
Planta 146, 579-584.
- Dixon, G.H. und H.S.Kornberg (1959). Assay methods for the enzymes of the glyoxylate cycle.
J.Biochem. 72, 3.

- Drumm, H. und P.Schopfer (1974). Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (Sinapis alba L.) seedlings. A reinvestigation. Planta 120, 13-30.
- Duntze, W., D.Neuman, J.M.Ganzedo, W.Atzpodien und H.Holzer (1969). Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J.Biochem. 10, 83-89.
- Engvall, E.P. und P.Pearlmann (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III.Quantitation of spezific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J.Immunol. 109, 129-135.
- Esaka, M. und T.Asahi (1982). Purification and properties of catalase from sweet potato root microbodies. Plant u.Cell Physiol. 23, 315-322.
- Flavell, R.B. und D.O.Woodward (1970). The concurrent regulation of metabolically related enzymes. The Krebs cycle and glyoxylate shunt enzymes in *Neurospora*. Eur. J.Biochem. 17, 284-291.
- Flavell, R.B. und D.O.Woodward (1971). Metabolic role, regulation of synthesis, cellular localization and genetic control of the glyoxylate cycle enzymes in *Neurospora crassa*. J.Bacteriol. 105, 200-210.
- Foo, S.K., S.S.Badour und E.R.Waygood (1971). Regulation of isocitrate lyase from autotrophic and phototrophic cultures of *Gloeomonas* sp. Can. J.Bot. 49, 1647-1653.
- Frederick, S.E., P.Gruber und E.H.Newcomb (1975). Plant Microbodies. Protoplasma 84, 1-29.
- Frevert, J. und H.Kindl (1978). Plant Microbody Proteins. Purification and glycoprotein nature of glyoxysomal isocitrate lyase from cucumber cotyledons. Eur. J.Biochem. 92, 35-43.

- Frevert, J., W.Köller und H.Kindl (1980). Occurrence and biosyntheses of glyoxysomal enzymes in ripening cucumber seeds. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 361, 1557-1565.
- Furuta, S., T.Hashimoto, S.Miura, M.Mori und M.Tatibana (1982). Cell free synthesis of the enzymes of peroxisomal β -oxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 639-646.
- Gamborg, O.L., R.A.Miller und K.Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soy-bean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151-158.
- Gemmrich, A.R. (1979). Isocitrate lyase in germinating spores of the fern *Anemia phyllitidis*. Phytochemistry 18, 1143-1146.
- Gerdes, H.-H., W.Behrends und H.Kindl (1982). Biosynthesis of a microbody matrix enzyme in greening cotyledons. Glycollate oxidase synthesized in vivo and in vitro. Planta 156, 572-578.
- Gerhardt, B. und H.Beevers (1970). Developmental studies in glyoxysomes in *Ricinus endosperm*. J.Cell Biol. 44, 94-102.
- Gerhardt, B. und T.Betsche (1976). The change of microbodies from glyoxysomal to peroxisomal function within fatty, greening cotyledons: hypotheses, results, problems. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 89, 321-334.
- Gerhardt, B. (1978). Microbodies/Peroxisomen pflanzlicher Zellen. Springer Verlag, Wien-New York.
- Giachetti, E., G.Pinzaüti, M.T.Vincenzini und P.Vanni (1982). On the stability of isocitrate lyase from *Pinus pinea*. Italien J.of Biochem. 31, 81-89.
- Gietl, C. und B.Hock (1982). Organelle-bound malate dehydrogenase isoenzymes are synthesized as higher molecular weight precursor. Plant Physiol. 70, 483-487.

- Gietl, C. und B.Hock (1984). Import of in-vitro-synthesized glyoxysomal malate dehydrogenase into isolated watermelon glyoxysomes. *Planta* 162, 261-267.
- Goldmann, B.M. und G.Blobel (1978). Biogenesis of peroxisomes: Intracellular site of catalase and uricase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5066-5070.
- Gonzales, E. und H.Beevers (1976). Role of the endoplasmic reticulum in glyoxysome formation in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 57, 406-409.
- Grabar, P. und C.A.Williams (1953). Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et innumochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 193.
- Gregor, H.D. (1977). Isolation of organelles from carrot cell suspension cultures. *Protoplasma* 91, 201-205.
- Griffith, M.W. (1979). The control of the synthesis of isocitrate lyase in a thermophilic bacillus. *J.Gen. Microb.* 112, 357-367.
- Hahlbrock, K. und E.Kuhlen (1972). Relationship between growth of Parsley and Soybean in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium. *Planta* 108, 271-278.
- Harrop, L.C. und H.L.Kornberg (1966). The role of isocitrate lyase in the metabolism of algae. *Proc. roy. soc. B* 166, 11-29.
- Hock, B. und H.Beevers (1966). Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris*-Schrad) - effects of dactinomycine and cycloheximide. *Z.Pflanzenphysiol.* 55, 405-414.

- Hock, B. (1969). Die Hemmung der Isocitratlyase bei Wassermelonen-Keimlingen durch Weißlicht. *Planta* 85, 340-350.
- Hock, B. (1974). Antikörper gegen die glyoxysomale Malat-Dehydrogenase. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 87, 109-118.
- Howe, J.G. und J.W.B.Hershey (1981). A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor levels in lysates of *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.* 256, 12836-12839.
- Huang, A.H.C. und H.Beevers (1971). Isolation of microbodies from plant tissues. *Plant Physiol.* 48, 637-641.
- Huang, A.H.C. und H.Beevers (1974). Developmental changes of germinating castor bean independent of embryonic axis. *Plant Physiol.* 54, 277-279.
- Huber, J., F.Constabel und O.L.Gamborg (1978). A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension culture of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Plant Science Lett.* 12, 209-215.
- Hunt, L., J.J.Skvarla und J.S.Fletcher (1978). Subcellular localization of isocitrate lyase in nongreen tissue culture cells. *Plant Physiol.* 61, 1010-1013.
- Ihle, J.N. und L.S.Dure (1972). The developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. III. Regulation of the biosynthesis of enzymes utilized in germination. *J.Biol. Chem.* 247, 5048-5055.
- John, P.C.L., C.F.Thurston und P.J.Syrett (1970). Disappearance of isocitrate lyase enzyme from cells of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. J.* 119, 913-919.

- Jones, G.L. und C.J.Masters (1978). On the synthesis and degradation of the multiple forms of catalase in mouse liver.
Arch. Biochem. Biophys. 187, 431-440.
- Kagawa, T., J.M.Lord und H.Beevers (1975). Lecithin synthesis during microbody biogenesis in watermelon cotyledons.
Arch. Biochem. Biophys. 167, 45-53.
- Kagawa, T. und H.Beevers (1975). The development of microbodies (glyoxysomes and leaf peroxisomes) in cotyledons of germinating seedlings. Plant Physiol. 55, 258-264.
- Kato, A. und K.Tsuji (1981). Growth-substrate relationship of Tobacco cells in suspension culture. J.Ferment. Technol. 59, 33-36.
- Key, J.L. (1966). Effect of purine and pyrimidine analogues on growth and RNA metabolism in the soybean hypocotyl - the selective action of 5-Fluorouracil. Plant Physiol. 41, 1257-1264.
- Khan, F.R., MSaleemuddin, M.Siddiqi und B.A.Mc Fadden (1977). Purification and properties of isocitrate lyase from flax seedlings.
Arch. Biochem. Biophys. 183, 13-23.
- Khan, F.R., M.Saleemuddin, M.Siddiqi und B.A.Mc Fadden (1979). The appearance and decline of isocitrate lyase in flax seedlings.
J.Biol. Chem. 254, 6938-6944.
- Kindl, H., W.Köller und J.Frevert (1980). Cytosolic precursor pools during glyoxysome biosynthesis. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 361, 465-467.
- Kindl, H., S.Schiefer und H.-G.Löffler (1980). Occurrence and biosynthesis of catalase at different stages of seed maturation. Planta 148, 199-207.

- Köller, W., J.Frevert und H.Kindl (1979). Incomplete glyoxysomes appearing at a late stage of maturation of cucumber seeds.
Z.Naturforsch. 34c, 1232-1236.
- Kudielka, R.A. (1980). Untersuchungen zur Regulation der Microbodies eukaryontischer Pflanzenzellen durch Substrate und Licht.
Dissertation, Botanisches Institut München.
- Kudielka, R.A. und R.R.Theimer (1983). Derepression of glyoxylate cycle enzyme activities in anise suspension culture cells.
Plant Sci. Lett. 31, 237-244.
- Kudielka, R.A. und R.R.Theimer (1983). Repression of glyoxysomal enzyme activities in anise (*Pimpinella anisum* L.) suspension cultures.
Plant Sci. Lett. 31, 245-252.
- Kudielka, R.A., H.Kock und R.R.Theimer (1981). Substrate dependent formation of glyoxysomes in cell suspension cultures of anise (*Pimpinella anisum* L.). FEBS Lett. 136, 8-12.
- Kruse, C., J.Frevert und H.Kindl (1981). Selective uptake by glyoxysomes of in vitro translated malate synthase. FEBS Lett. 129, 36-38.
- Lado, P., M.Schwendimann und E.Marré (1968). Repression of isocitrate lyase synthesis in seeds germinated in the presence of glucose.
Biochem. Biophys. Acta 157, 140-148.
- Laemmli, U.K. (1970). Clearance of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lamb, J.E., H.Riezman und W.M.Becker (1978). Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. 2.Isolation and immunological detection of isocitrate lyase and catalase.
Plant Physiol. 62, 754-760.

- Linsmaier, E.M. und F.Skoog (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18, 100.
- Liu, K.D.F. und A.Huang (1977). Subcellular localization and developmental changes of aspartate- α -ketoglutarate transaminase isozymes in the cotyledons of cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 59, 777-782.
- Longo, C.P. und G.P.Longo (1970). The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiol.* 45, 249-254.
- Lord, J.M., B.A.Mc Fadden und H.L.Kornberg (1974). Changes in microbody-marker enzymes during growth of *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. R.Soc. Lond.* 185, 19-31.
- Lord, J.M., F.Kagawa, T.S.Moore und H.Beevers (1973). Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J.Cell. Biol.* 57, 659-667.
- Lord, J.M. und L.Bowden (1978). Evidence that glyoxysomal malate synthase is segregated by the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 61, 266-270.
- Lück, H. (1965). Catalase. In: *Methods of enzymes analysis* (Hrsg.: H.U.Bergmeyer), S.885. Acad. Press, New York.
- Lutzenberger, A. und R.R.Theimer (1983). Fatty acid β -oxidation and glyoxylate cycle enzyme activities of induced glyoxysomes from anise suspension cultures. *Plant Cell Reports* 2, 160-163.
- Malhotra, O.P. und P.K.Srivastava (1982). Isolation and characterization of isocitrate lyase of castor endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 164-171.

- Mc Cullough, W. und P.C.L.John (1972b). Control of de novo isocitrate lyase synthesis in *Chlorella*. *Nature* 239, 402-404.
- Miernyk, J.A., R.N.Trelease und J.S.Choinski Jr. (1979). Malate synthase activity in cotton and other ungerminated oilseeds. *Plant Physiol.* 63, 1068-1071.
- Miernyk, J.A. und R.N.Trelease (1981). Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. IV. β -Oxidation. *Plant Physiol.* 67, 341-346.
- Mirault, M.E. und K.Scherrer (1971). Isolation of pre-ribosomes from HeLa cells and their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels. *Eur. J.Biochem.* 23, 372-386.
- Möllering, H. und W.Gruber (1966). Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.* 17, 369-376.
- Möllering, H. (1974). Bestimmung von Äpfelsäure in Lebensmitteln. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg.: H.U.Bergmeyer), 2, 1636-1639; Verlag Chemie, Weinheim.
- Moore, T.S. und H.Beevers (1974). Isolation and characterization of organelles from soybean suspension cultures. *Plant Physiol.* 53, 261-265.
- Nabeshima, S., A.Tanaka und S.Fukui (1977). Effect of carbon sources on the level of glyoxylate cycle enzymes in n-alkane-utilizable yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 41, 275-279.
- Ochoa, S. (1955). Malic dehydrogenase from pig heart. In: Methods in Enzymology, Vol I (Hrsg.: S.P. Colowick und N.O.Kaplan), S.735; Acad. Press, New York.

- Osumi, M., H.Kazama und S.Sato (1978). Microbody associated DNA in *Candida tropicalis* pK 233 cells. FEBS Lett. 90, 309-312.
- Ouchterlony, O. (1949). Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507-517.
- Overath, P., E.M.Raufuss, W.Stoffel und W.Ecker (1967). The induction of enzymes of fatty acid degradation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 28-33.
- Pinzauti, G., E.Giachetti und P.Vanni (1982). Isocitrate lyase of conifers (*Pinus pinea*). Int. J.Biochem. 14, 267-275.
- Pinzauti, G., E.Giachetti und P.Vanni (1983). Isocitrate lyase: Artifacts and multiple enzyme forms. Arch. Biochem. Biophys. 225, 137-142.
- Racker, E. (1950). Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochem. Biophys. Acta 5, (Amst.), 211-214.
- Rao, G. und B.A.Mc Fadden (1965). Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera* (III). Specificity and inhibition. Arch. Biochem. Biophys. 112, 294-303.
- Reiß, U. und M.Rothstein (1974). Isocitrate lyase from the free-living nematode *Turbatrix aceti*, purification and properties. Biochemistry 13, 1796-1800.
- Riezman, H., E.M.Weir, C.J.Leaver, D.E.Titus und W.M.Becker (1980). Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. 3. In vitro translation and characterization of four glyoxysomal enzymes. Plant Physiol 65, 40-46.

- Robbi, M. und P.B.Lazarow (1982). Peptide mapping of peroxisomal catalase and its precursor.
J.Biol. Chem. 257, 964-970.
- Robbi, M. und P.B.Lazarow (1978). Synthesis of catalase in two cell-free protein-synthesizing systems and in rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4344-4348.
- Roberts, L.M. und J.M.Lord (1981). Synthesis and post-translational segregation of glyoxysomal isocitrate lyase from castor bean endosperm. Eur. J.Biochem. 119, 43-49.
- Romano, A.H. und H.L.Kornberg (1969). Regulation of sugar uptake by *Aspergillus nidulans*. Proc. Roy. Soc. B 173, 475-490.
- Scandalios, J.G. (1968). Genetic control of multiple molecular forms of catalase. Ann. N.Y.Acad. Sci. 151, 274-293.
- Schaffner, W. und C.Weissmann (1973). A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochem. 56, 502-514.
- Schiefer, S., W.Teifel und H.Kindl (1976). Plant microbody proteins. I. Purification and characterization of catalase from leaves of *Lens culinaris*. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 357, 163-175.
- Schmid-Neuhaus, B. (1978). Untersuchungen zum Mechanismus der Funktionsänderung von Microbodies in den belichteten Kotyledonen von Sonnenblumenkeimlingen (*Helianthus annuus*). Dissertation, Botanisches Institut München.

- Schopfer, P., D.Bajracharya, R.Bergfeld und H.Falk (1976). Phytochrome-mediated transformation of glyoxysomes into peroxisomes in the cotyledons of mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 133, 73-80.
- Schuh, B. und B.Gerhardt (1984). Size of the microbody population in sunflower cotyledons during the transition in cotyledonary microbody function. *Z.Pflanzenphysiol.* 114, 477-484.
- Smith, R.H., A.M.Schubert und C.R.Benedict (1974). The development of isocitrate lyase activity in germinating cotton seed. *Plant Physiol.* 54, 197-200.
- Steinmann, H.M. und R.L.Hill (1975). Enoyl-CoA-Hydratase (crotonase). In: *Methods of Enzymology* 35, 136-151.
- Szabo, A.S. und J.Avers (1969). Some aspects of regulation of peroxisomes and mitochondria in yeast. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 168, 302-312.
- Surendranathan, K.K. und P.M.Nair (1978). Purification and characterization of a natural inhibitor for isocitrate lyase, present in gamma-irradiated preclimacteric banana. *Plant Sci. Lett.* 12, 169-175.
- Syrett, P.J., M.J.Merrett und S.M.Bocks (1963). Enzymes of the glyoxylate cycle in *Chlorella vulgaris*. *J.Exp. Bot.* 14, 249-264.
- Tester, C.F. (1976). Control of the formation of isocitrate lyase in soybean cotyledons. *Pl. Sci. Lett.* 6, 325-333.
- Theimer, R.R. und P.Heidinger (1974). Control of particulate urate oxidase activity in bean roots by external nitrogen supply. *Z.Pflanzenphysiol.* 73, 360-370.

- Theimer, R.R., G.Anding und B.Schmid-Neuhaus (1975).
Density labeling evidence against a de novo
formation of peroxisomes during greening of
fat-storing cotyledons. FEBS Lett. 57, 89-92.
- Theimer, R.R. (1976). A specific inactivator of glyoxy-
somal isocitrate lyase from sunflower
(*Helianthus annuus* L.) cotyledons.
FEBS Lett. 62, 297-300.
- Theimer, R.R., G.Wanner und G.Anding (1978). Isolation
of two types of microbody from *Neurospora*
crassa cells. Cytobiol. 18, 132-144.
- Theimer, R.R. und E.Theimer (1975). Studies on the deve-
lopment and localization of catalase and
 H_2O_2 -generating oxidase in the endosperm of
germinating castor beans. Plant physiol. 56,
100-104.
- Thurston, C.F., C.L.Graves und P.J.Syrett (1973). The
effect of metabolic inhibitors on the loss
of isocitrate lyase activity from *Chlorella*.
Arch. Microbiol. 88, 135-146.
- Thurston, C.F. (1977). Control of isocitrate lyase
synthesis in *Chlorella fusca* var. *vacuolata*.
Biochem. J. 164, 147-151.
- Tolbert, N.E., A.Oeser, T.Kisaki, R.H.Hagemann und
R.K.Yamasaki (1968). Peroxisomes from
spinach leaves containing enzymes related to
glycolate metabolism. J.Biol Chem. 243,
5179-5184.
- Tolbert, N.E., R.K.Yamasaki, R.H.Hagemann und T.Kisaki
(1969). A survey of plants for leaf per-
oxisomes. Plant Physiol. 44, 135-147.
- Tolbert, N.E. (1971). Microbodies - peroxisomes and
glyoxysomes. Ann. Rev. Plant Physiol. 22,
45-74.

- Tolbert, N.E. (1981). Methabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 133-157.
- Towbin, H., T.Staehlin und J.Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Trelease, R.N. (1984). Biogenesis of glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 321-347.
- Ulrich, B. und M.H.Zenk (1979). Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* 18, 929-933.
- Vanni, P., M.T.Vincenzini, F.M.Nerozzi und S.P.Sinha (1979). Studies on isocitrate lyase from lupinus cotyledons. *Can. J.Biochem.* 57, 1131-1137.
- Vigil, E.L. (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J.Cell. Biol.* 46, 453-454.
- Vincenzini, M.T., F.Nerozzi, F.F.Vinciери und P.Vanni (1980). Isolation and properties of isocitrate lyase from lupinus seed. *Phytochemistry* 19, 769-774.
- Wanner, G., E.L.Vigil und R.R.Theimer (1982). Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark-grown watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) seedlings. *Planta* 156, 314-325.
- Weber, K. und M.Osborn (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol. Chem.* 244, 4406-4412.

- Weir, E.M., H.Riezman, J.-M.Grienenberger, W.M.Becker und C.J.Leaver (1980). Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. Temporal changes in translatable mRNAs for isocitrate lyase and malate synthase. Eur. J.Biochem. 112, 469-477.
- Werner, W., H.G.Rey und H.Wielinger (1970). Z.analyt. Chem., 252, 224.
- White, J.E. und M.Brody (1974). Enzymatic characterization of sucrose-gradient microbodies of dark-grown, greening and continuously light-grown *Euglena gracilis*. FEBS Lett. 40, 325-330.
- Witt, I., R.Kronau und H.Holzer (1966). Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. Biochim. Biophys. Acta 118, 522-537.
- Yamada, T., A.Tanaka, S.Horikawa, S.Numa und S.Fukui (1982). Cell free translation and regulation of *Candida tropicalis* catalase messenger RNA. Planta 129, 251-255.
- Yamaguchi, J. und M.Nishimura (1984). Purification of glyoxysomal catalase and immunochemical comparison of glyoxysomal and leaf peroxisomal catalase in germinating Pumpkin cotyledons. Plant physiol. 74, 261-267.
- Zemlyanukhin, L.A., A.U.Igamberdiev und A.A.Zemlyanukhin (1984). Purification and properties of isocitrate lyase from sunflower. Translated from Biokhimiya, 49, 387-393.
- Zimmermann, R. und W.Neupert (1980). Biogenesis of glyoxysomes. Synthesis and intracellular transfer of isocitrate lyase. Eur. J.Biochem. 112, 225-233.

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.R.R.Theimer von 1981 bis 1985 angefertigt.

Herrn Prof.Theimer möchte ich für sein unermüdliches Interesse und seine vielfältigen Ratschläge herzlichst danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.B.Hock, Weihenstephan, für die hervorragende Einführung in die Immunologie und für die tatkräftige Unterstützung bei der Gewinnung der Antiseren.

Außerdem danke ich Dr.G.Schmid und Dr.O.Strobel vom Arbeitskreis Prof.A.Böck und Priv.-Doz. Dr.R.Hensel für wertvolle Diskussionen und praktische Hinweise zum Gelingen der Experimente.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern des Botanischen Institut.

Ganz besonders danke ich meiner Frau für ihre geduldige Anteilnahme und die Niederschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

1952	Geboren in Günzburg am 18. Oktober
1959 bis 1963	Volksschule in Günzburg
1963 bis 1973	Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium in Günzburg
1973 bis 1975	Bundeswehr
1975	Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1978	Vordiplomprüfung
1980	Diplomhauptprüfung
1980 bis 1981	Diplomarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer
1981	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer am Botanischen Institut der Universität in München

